

VCH-FC
MAG-B
CISO
C.1



**Obtención de híbridos de *Saccharomyces cerevisiae*, capaces de utilizar
xilosa o lactosa como fuente de carbono.**

Entregada a la Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos para optar
al grado de Magister en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias

Héctor Joel Calfullán Díaz

Septiembre 2015

Santiago-Chile

Director de Tesis: Dr. Marcelo Baeza Cancino

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGÍSTER

**Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la
Tesis de Magíster presentada por el candidato.**

HÉCTOR JOEL CALFULLÁN DIAZ

**Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como
requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas en el
exámen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 10 de junio de
2015.**

Director de Tesis:

Dr. Marcelo Baeza Cancino

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Margarita Carú Marambio

Dra. Claudia Stange Klein



“Mis más sinceros agradecimientos a la familia por el apoyo incondicional”.

RESUMEN BIOGRÁFICO



Nací el 19 de marzo de 1975 en la ciudad de Santiago. Realice mi enseñanza básica en el Colegio Little College, ubicado en la comuna de la Florida. Al finalizar mi enseñanza media ingrese a estudiar Pedagogía en Biología y Ciencias naturales en la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, defendiendo mi memoria de Título sobre “Tipificación molecular de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis por ADN polimórfico amplificado al azar(RAPD) “, obtenido el título de Profesor de Biología, luego ingrese al magister en ciencias biológicas en la Universidad de Chile, con la finalidad de proseguir una carrera científica.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar, a Marcelo quien fue lejos un verdadero mentor, ya que no solo me integró a su grupo de investigación, sino que además siempre guió mi trabajo, por medio del consejo certero, tanto en el ámbito científico como humano. A los Dres. Victor Cifuentes y Jennifer Alcaíno por la ayuda brindadas en el desarrollo de ésta tesis y de igual manera a Dony por su disposición para responder al gran número de preguntas que se originaban en el día a día, así como por esas largas conversaciones de actualidad y política. A mis compañeros de Lab: Pame, Gaby, Sole, Nicole, Carlita, Jaime, Meli y en especial al grupo de trabajo "Killer": Ori, Pablo, Mario, Yassef, Gabriel, Evelin quienes estuvieron en cada momento. Al Salva por su paciencia y buena voluntad.

Por otro lado como olvidar al bienhechor Rafa, por su constante buen humor y consejo, así como por su tiempo y dedicación a los alumnos.

Finalmente a toda mi familia por el apoyo incondicional para lograr alcanzar ésta nueva meta propuesta. Gracias a todos!!!

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos	iii
Índice general.....	iv
Índice de tablas	vii
Índice de figuras.....	viii
Abreviaturas.....	x
Resumen	xii
Abstract.....	xiv
1.- Introducción.....	1
Hipótesis	10
Objetivos.....	11
2.- Materiales y métodos.....	12
2.1.- Materiales	12
2.2.- Método.....	13
2.2.1.- Preparación de protoplastos y fusión.....	13
2.2.1.1.- Medios de cultivo	13
2.2.1.2.- Preparación de protoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	13

2.2.1.3.- Preparación de protoplastos a partir de aislados antárticos	14
2.2.1.4.- Construcción del plasmidio pYES-2Hyg	15
2.2.1.4.1.- PCR de colonia	17
2.2.1.5.- Fusión de protoplastos y selección de fusantes	17
2.3.- Caracterización del crecimiento y fermentación alcohólica en xilosa y lactosa de los aislados antárticos	18
2.4.- Diseño de partidores	18
2.4.1.1.- Extracción de DNA genómico.	19
2.4.1.2.- PCR	19
2.4.1.3.- Purificación de DNA desde geles de agarosa.....	20
2.4.1.4.- Preparación de células electrocompetentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	20
2.4.1.5.- Clonamiento de los productos de PCR en pBlueScript(PBS).....	20
2.4.1.6.- Secuenciación automática de DNA y análisis de datos.....	21
3.-Resultado	22
3.1.- Obtención de fusantes	22
3.1.1.-Construcción del plasmido pYES-2Hyg	22
3.1.2.- Preparación, fusión y regeneración de protoplastos entre distintas levaduras	24
3.2.-Crecimiento en xilosa o lactosa y ensayo de fermentación alcohólica.	28
3.2.1.- Análisis levaduras antárticas en su capacidad de crecer en lactosa.....	28

3.2.2.- Análisis de levaduras antárticas en su capacidad de crecer en xilosa	29
3.2.3.- Ensayo de fermentación alcohólica en campana Durham.....	31
3.3.- Identificación de genes asociados al metabolismo de xilosa y lactosa	32
3.3.1.-Amplificación, purificación y secuenciación de genes de la vía de utilización de xilosa y lactosa en aislados antárticos	32
4.- Discusión	41
5.- Conclusiones	51
6.- Bibliografía.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Levaduras utilizadas en el presente trabajo.....	12
Tabla 2.- Resultado de la obtención de fusantes luego del proceso de regeneración.....	27
Tabla 3.- Ensayo de fermentación alcohólica en campana Durham, en distintos medios ricos y mínimos suplementados con lactosa, xilosa, así como adición de glucosa al 5%....	32
Tabla 4.- Partidores degenerados.....	34
Tabla 5.- Tamaño de los amplicones, obtenidos con los partidores degenerados para cada probable gen, en cada uno de los aislado antárticos.....	35
Tabla 6.- Análisis mediante Blastx de los distintos amplicones clonados en pBlueScript, relacionados con la vía de utilización de xilosa.....	37
Tabla 7.- Partidores específicos.....	38
Tabla 8.- Análisis mediante Blastx de los distintos amplicones clonados en pBlueScript, de la vía de utilización de xilosa.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ruta metabólica de la xilosa	5
Figura 2.- Ruta de Weinberg y Dahms para la degradación de xilosa.....	7
Figura 3.- Ruta catabólica de lactosa.....	9
Figura 4.- Esquema de los plasmidos utilizados.....	16
Figura 5.- Electroforesis de los amplicones correspondientes al inserto de higromicina.....	23
Figura 6.- Estrategia para confirmar la fusión de protoplastos.....	23
Figura 7.- Formación de protoplastos en presencia de Zymoliasa	26
Figura 8.-Curvas de crecimiento de las levaduras <i>Cr. victoriae</i> y <i>D. fristingensis</i> cultivadas en medio mínimo (Vlac y SDlac) y medio rico (YMLac), ambos suplementados con 2% lactosa a una temperatura de 22°C con agitación.....	29
Figura 9.- Curva de crecimiento de las levaduras <i>C. sake</i> , <i>Cr. gilvescens</i> , <i>Cr. victoriae</i> , <i>D. fristingensis</i> , <i>Rh. laryngis</i> y <i>W. Anomalous</i> en medio MMVogel 2% xilosa a 22°C con agitación.....	30
Figura 10.- Curva de crecimiento de las levaduras <i>C. sake</i> , <i>Cr. gilvescens</i> , <i>Cr. victoriae</i> , <i>D. fristingensis</i> y <i>Rh. laryngis</i> y <i>W. anomalous</i> en MM SD 2% xilosa a 22°C con agitación.....	31
Figura 11.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra los amplicones obtenidos con partidores degenerados	36

Figura 12.- Amplicones obtenidos al usar partidores específicos sobre ADN molde de
W. anomalus39

ABREVIATURAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético.
HDX	Transportador Xilosa.
HXT	Transportador Hexosa.
KGAL1	Galactokinasa.
LACT	Lactasa.
MM	Medio Mínimo.
PBS	pBlueScript.
PEG	Polietilenglicol.
PRK	B-xilosidasa.
RKI	Receptor Kinasa.
RPE1	Ribulosa fosfato epimerasa.
SD	Synthetic Defined Yeast Nitrogen Base.
SD^L	Medio mínimo SD lactosa higromicina.
SD^X	Medio mínimo SD xilosa higromicina.
TAE	Amortiguador Tris-Ac. Acético, EDTA.
TAL	Transaldolasa.
TE	Amortiguador Tris-EDTA.
TKL1	Transketolasa.
XK	Xilulosa kinasa.

XKS1	D-xilulokinasa.
Xyl	Xilosa reductasa.
YM	“Yeast Medium”
YMH	Medio completo higromicina.
YM^L	Medio completo lactosa higromicina.
YM^X	Medio completo xilosa higromicina.
YNB	Yeast Nitrogen Base.

RESUMEN

El uso de levaduras para obtener bioalcoholes de “segunda generación” usando derivados de la industria agrícola y lechera, tiene un impacto positivo para el medio ambiente al reutilizar estos desechos. Sin embargo, la incapacidad de los microorganismos industriales, para fermentar eficientemente hidrolizados lignocelulósicos o bien suero lácteo, siguen impidiendo la producción de bioalcoholes a partir de estas fuentes abundantes en forma sostenible. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es ampliamente utilizada en relación a la producción de bioetanol, pero existen limitaciones en la fermentación de materiales lignocelulósicos y desechos de la industria lechera. Como estrategia para obtener una levadura que pueda fermentar xilosa o lactosa se han clonado en *S. cerevisiae*, una serie de genes de bacterias y otros hongos, pero ésta técnica tiene sus desventajas, por ser un método muy dirigido, complejo y la consecuencia de la modificación no siempre es la esperada. Las tecnologías de reproducción, ingeniería genética y la búsqueda de especies aún no descubiertas son prometedoras, ya que se podrían generar microorganismos robustos que presenten alto rendimiento y productividad en la bioconversión de masa lignocelulosica, lácteas y resistentes a los inhibidores propios del proceso de fermentación.

Nuestro grupo aisló e identificó una serie de levaduras en la región sub-Antártica, de las cuales varias son capaces de utilizar xilosa o lactosa, como única

fuelle de carbono. Una estrategia es “traspasar” esta capacidad a *S. cerevisiae* mediante métodos parasexuales, obteniendo cepas híbridas capaces de realizar la fermentación alcohólica de xilosa o lactosa. Esta estrategia presenta la ventaja de no necesitar conocimiento acabado de los genes de las rutas metabólicas de estas fuentes de carbono, pero existe la posibilidad de incompatibilidad genética entre las levaduras a fusionar. Por ello otra alternativa es la ingeniería metabólica, en la cual se expresan en *S. cerevisiae* los genes necesarios para otorgar la capacidad de utilizar y fermentar las mencionadas fuentes de carbono.

En el presente trabajo se optimizó una metodología para la fusión de especies de levaduras antárticas con *S. cerevisiae*, no obstante si bien se pudieron obtener híbridos en primera instancia, estos no fueron estables. Por ello, como estrategia alternativa se realizó la búsqueda de genes que codifiquen las enzimas de la ruta metabólicas de la xilosa y lactosa, necesarias para otorgar dicha capacidad a *S. cerevisiae*. En el caso de la xilosa, *S. cerevisiae*, tiene la ruta metabólica que permite hacer uso de esta fuente carbonada, pero no puede reciclar el poder reductor generado ya que ha evolucionado en un ambiente que privilegia la glucosa. En la vía de utilización de lactosa *S. cerevisiae*, carece de una permeasa que permite el ingreso al citoplasma de lactosa. Por ello, se diseñaron partidores degenerados con los cuales se pudo amplificar y clonar parte de los genes codificante para una xilosa reductasa, un transportador de xilosa, una ribulosa fosfato 3 epimerasa y una transaldolasa. En el caso de los genes de vía de utilización de lactosa, no se obtuvieron resultados positivos, inclusive usando partidores específicos descritos en literatura.

ABSTRACT

The use of yeasts to obtain bio-alcohols of "second generation" from agricultural and dairy industry wastes, have a positive impact on the environment. However, the industrial microorganisms currently used, mainly isolates of *Saccharomyces cerevisiae*, cannot ferment efficiently lignocellulosic hydrolyzates or lactose of whey, preventing the sustainable production of bio-alcohols from these abundant sources. Efforts have been made to obtain *S. cerevisiae* able to ferment xylose or lactose by a heterologous expression of the necessary genes from bacteria and other fungi; however the results obtained are not sufficient for a industrial application. Reproductive technologies, genetic engineering, and the search for undiscovered species are promising, since they could generate robust microorganisms that show a high performance and productivity for the bioconversion of lignocellulosic, dairy, and resistant to the extreme conditions of the fermentation at large scale.

Our group isolated and identified yeast species in the sub-Antarctic region, several of which are able to use xylose or lactose as sole carbon source. One strategy is to transfer this ability to *S. cerevisiae* using parasexual methods, in order to obtain hybrid strains capable to carry out alcoholic fermentation of xylose or lactose. The main advantage of this strategy is that not require thorough knowledge of the genes of the corresponding metabolic pathways, but there is a possibility of genetic incompatibility between the yeasts to be fused. An alternative is the metabolic engineering, in which the

key genes required for *S. cerevisiae* to ferment these carbon sources, are expressed from other microorganisms.

In this work, a methodology for the fusion of different yeast species with *S. cerevisiae* was optimized. Although hybrids were obtained, they were not stable. Alternatively, the search strategy of genes encoding enzymes of the xylose pathway and lactose, necessary to provide this capability to *S. cerevisiae* was performed. In the case of xylose, *S. cerevisiae* possesses the metabolic pathway that allows using this carbon source, but it cannot recycle the generated reducing power that has evolved in an environment which favors glucose. In the lactose utilization pathway, *S. cerevisiae* lacks a permease that allows the import of lactose. For that, degenerate primers were designed that allow the amplification and partial cloning genes for xylose reductase, a xylose transporter, a ribulose phosphate 3-epimerase, and a transaldolase. For lactose utilization pathway genes, positive results were not obtained, even using specific primers described in literature.

1. INTRODUCCIÓN

El agotamiento de las reservas de petróleo, así como el aumento en el costo de la gasolina a nivel mundial, a dado pie al uso de combustibles alternativos como los bioalcoholes, en cuya producción se han usado como materias primas los cereales y la caña de azúcar (Byron y Hung, 2007). Sin embargo, la utilización de éstos alimentos para la fabricación de biocombustibles actualmente representa un dilema ético. La obtención de etanol desde fuentes que no sean recursos alimenticios, llamados de “segunda generación”, tiene un gran potencial como fuente de bioenergía y un impacto positivo en el medio ambiente al utilizar desechos de otras industrias como sustrato (Laluce y cols., 2012). Una posibilidad es el uso de residuos agrícolas lignocelulósicos y lecheros, no obstante aún no son bien explotados debido a la incapacidad de los microorganismos industriales, para fermentar eficientemente los azúcares presentes en estos residuos (Kumari y Pramanik, 2012; Guo y cols., 2012). Por lo anterior, es que actualmente los esfuerzos se han centrado en mejorar por ingeniería genética a los microorganismos ya existentes en la industria, así como en la búsqueda de especies no descubiertas aún. Para ello, las nuevas especies deben ser caracterizadas y seleccionadas en cuanto a ser robustas en cuanto a productividad, rendimiento, resistencias a inhibidores y a los productos propios de la fermentación (Kumari y Pramanik, 2012).

En la actualidad, la levadura con más presencia en la industria biotecnológica es *S. cerevisiae*, que es ampliamente utilizada entre otros procesos en la producción de

bioetanol a partir de la caña de azúcar y almidón. Sin embargo, posee limitaciones para la fermentación de materiales lignocelulósicos y desechos de la industria lechera, ya que no puede utilizar los azúcares más abundantes como son la xilosa y la arabinosa, así como la galactosa obtenida de la hidrólisis de la lactosa. (Byron y cols., 2007; Feldmann y cols., 2005). *S. cerevisiae* no puede hacer uso de xilosa o lactosa como fuente de carbono, ya que no posee transportadores de alta afinidad por xilosa y carece tanto de β -galactosidasa así como del sistema permeasa, necesarios para la utilización de la lactosa. (Byron y cols., 2007; Anuradh y Sandun, 2008). Como estrategia para enfrentar la incapacidad, para hacer uso de xilosa o lactosa se han clonado en *S. cerevisiae*, una serie de genes de bacterias y otros hongos relacionados con el metabolismo de estos azúcares, con el objetivo de mejorar el proceso de fermentación, pero la aplicación de esta herramienta de ingeniería genética tiene sus desventajas, por ser un método muy dirigido, extremadamente complejo, y la consecuencia de la modificación no siempre es la esperada (Wouter y cols., 2009).

Una metodología alternativa es la obtención de cepas híbridas mediante fusión de protoplastos (Eddy y William, 1974), aplicada en la fusión interespecíficas entre levaduras de una especie, como por ejemplo algunas cepas de *S. cerevisiae* tolerante a temperatura y otra tolerante al etanol (Stphens y cols., 2007). También se ha descrito la fusión intergenérica entre *S. cerevisiae* (tolerante a altas concentraciones de etanol) y *Kluyveromyces fragilis* (capaz de utilizar la lactosa) para generar híbridos poliploides y aneuploides capaces de hidrolizar lactosa y producir etanol, pero aún a niveles insuficientes para una producción a escala industrial (Kavanagh y Whittaker, 1996). Es

importante destacar que aunque la elaboración de protoplastos y posterior fusión es compleja y depende de varios factores para su éxito, comenzando por la obtención, selección y estabilidad del fusante, ésta representa una muy buena técnica que permite reunir las mejores características fenotípicas de las especies a fusionar (Guzmán y cols., 2009).

Considerando además que existe un número limitado de microorganismos que responden adecuadamente a los requerimientos antes mencionados, uso de xilosa o lactosa, la tendencia actual es buscar levaduras ambientales que puedan ser usadas en la generación de bioetanol, a partir de las materias primas de segunda generación o bien, en su defecto, poder traspasar dichas capacidades a *S. cerevisiae*. En nuestro laboratorio contamos con una colección de diferentes especies de levaduras aisladas desde la región sub-antártica, y en ensayos preliminares varias de ellas mostraron la capacidad de asimilar xilosa y/o lactosa. Esto las convierte en candidatos atractivos para probar la factibilidad de la fusión de las cepas aisladas de *S. cerevisiae* y/o análisis de los genes necesarios para la utilización de xilosa y lactosa.

A continuación se describe el catabolismo de la xilosa y la lactosa haciendo énfasis en los genes más importantes en ambas ruta y que permitirían transformar con dichas capacidades a *S. cerevisiae*.

Catabolismo de la D-Xilosa.

La xilosa puede ser metabolizada por una gran variedad de microorganismos como bacterias y levaduras, y se han descrito cuatro rutas catabólicas: La vía oxo-

reductiva o XR-XDH presente en eucariontes, la vía isomerasa, la ruta Weimberg y la vía Dahms comunes para ciertos procariontes (Jeffries y Jin, 2000).

Ruta Oxo-Reductiva o Vía Xilosa reductasa-xilitol deshidrogenasa.

Esta ruta es común en hongos filamentosos, levaduras y en otros eucariontes y se caracteriza, por la existencia de tres enzimas fundamentales, la xilosa reductasa, xilitol deshidrogenasa y xilulosa kinasa, la primera reduce la D-xilosa a xilitol utilizando para ello NADH o NADPH y la segunda oxida el xilitol a D-xilulosa usando para ello NAD(P)H como cofactor y la tercera enzima fosforila a la D-xilulosa, para dar lugar como producto final D xilulosa 5 fosfato, que es un intermediario de la vía de las pentosas fosfato. Importante es destacar que un desequilibrio a nivel de cofactor NAD puede dar origen a una sobreproducción de xilitol impidiendo el paso a la ruta de las pentosas (Stephens, C y cols., 2007). En la figura 1 se muestra un esquema con la ruta oxo-reductiva.

La ruta oxo-reductiva confluye en la vía de las pentosas en donde existen cuatro enzimas que metabolizan la D-xilulosa 5-fosfato y que son focos de distintas investigación como: ribulosa 5-fosfato isomerasa (RKI), ribulosa 5-fosfato epimerasa (RPE1), transketolasas (TKL1) y transaldolasas (TAL).

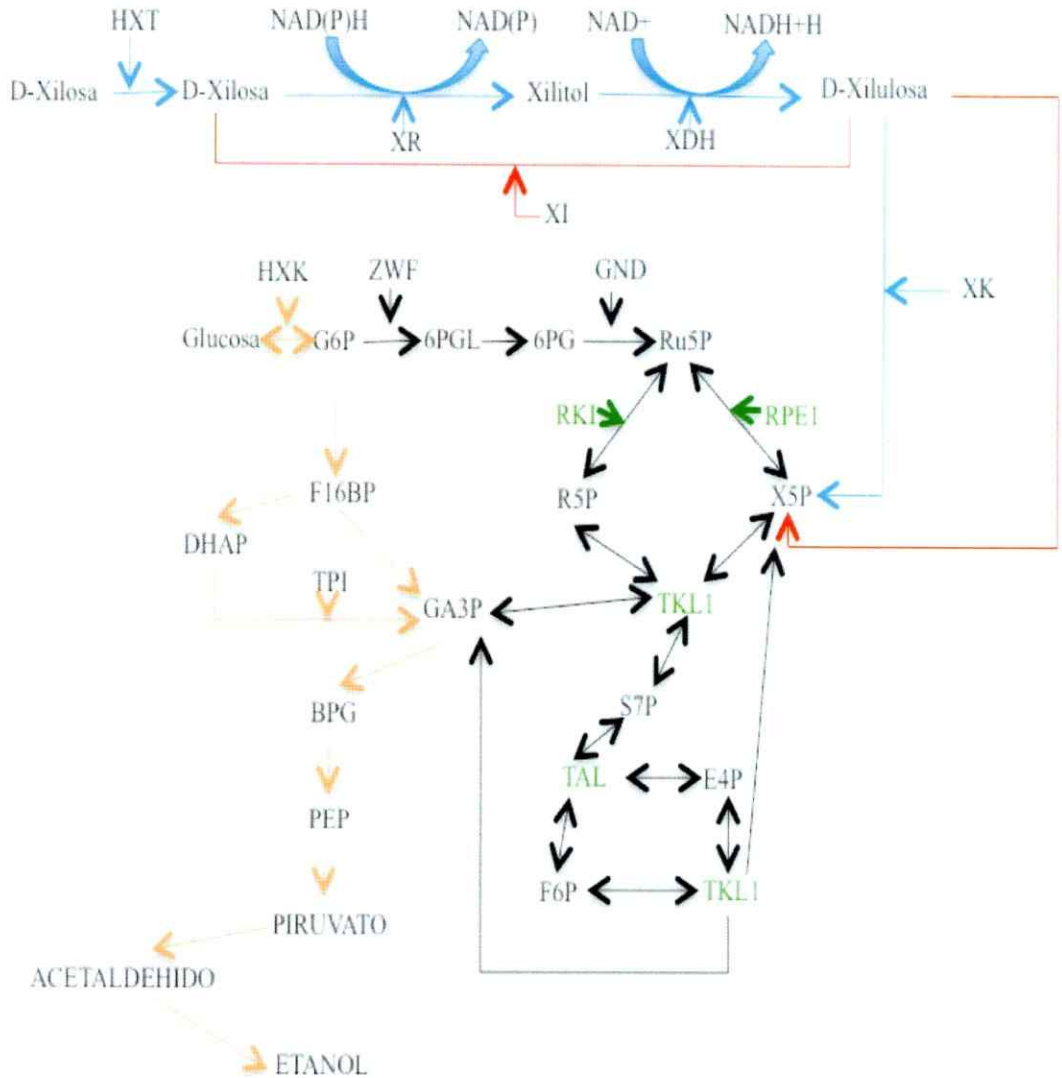


Figura 1.-Ruta metabólica de la xilosa. En ella se indica la ruta oxo-reductiva (línea azul), y la vía xilosa isomerasa (línea roja). En verde los principales genes de la vía de las pentosas posibles de identificar y transformar en *S. cerevisiae*; ribulosa 5-fosfato isomerasa (RKI), ribulosa 5-fosfato epimerasa (RPE1), transketolasas (TKL1), y transaldolasas (TAL). Extraído de Byron, C y Hung, L 2007. Abreviaturas: HXT, transportador de hexosas; XR, xilosa reductasa; XDH, xilitol deshidrogenasa; XK, xilulosa kinasa; HXK, hexosa kinasa; G6P, glucosa 6-fosfato; ZWF glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa; 6PGL, 6 fosfo-D-glucono-1,5-lactona; 6PG, fosfo D-gluconato; GND, 6 fosfogluconato dehidrogenasa; Ru5P, L-ribulosa-5-fosfato; RKI, ribulosa 5-fosfato isomerasa; R5P, ribosa 5-fosfato; RPE1, ribulosa 5-fosfato epimerasa; X5P, xilosa 5-fosfato; TKL1, transketolasa; S7P sedoheptulosa 7-fosfato; E4P, eritrosa 4-fosfato; TAL, transaldolasa; F6P, fructosa 6-fosfato; GA3P, gliceraldehido 3-fosfato; TPI, triosa fosfato isomerasa; F16BP, fructosa-1, 6-bifosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; BPG, 1,3 bifosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato.

Ruta de la xilosa isomerasa.

Una segunda ruta catabólica, para xilosa, es la vía xilosa isomerasa descrita en bacterias como *Pseudomonas sp*, *E. coli* y *Burkholderia sp*. En esta ruta existe una transformación directa de D-xilosa a D-xilulosa por medio de la enzima xilosa isomerasa, posteriormente existe una fosforilación de la D-xilulosa por medio de una xilulosa kinasa dando como producto final D-xilulosa-5-fosfato que entra a la vía de las pentosas, tal como se observa en la Fig 1. En bacterias como *E. coli* los genes de esta vía están organizados en el operón *xyl*, dónde el gen *xylA* codifica para la xilosa isomerasa (XI) y el *xylB* para una xiluloquinasa, en cambio en *Pseudomonas sp* y *Burkholderia sp.*, estos genes se encuentran en varias regiones del genoma (Lopes y col., 2009).

Por otro lado, en bacterias existe un sistema transportador de xilosa específico, que esta representados por los genes *xylG* (proteína de unión a ATP), *xylH* (transportador de membrana), *xylF* (proteína de unión a xilosa), y *xylR* (un regulador transcripcional). Es por la existencia de esta ruta metabólica en bacterias que muchos de estos genes, han sido utilizado en expresión heteróloga en *S. cerevisiae*.(Jeffries y Jin Y, 2000).

Rutas de Weinberg y Dahms

La ruta de Weinberg como la ruta Dahms se han descrito en arqueas y bacterias. En ambas rutas la D-xilosa es transformada en 2-ceto 3-desoxi-xilonato con la participación de tres enzimas: una xilosa deshidrogenasa que transforma la D-xilosa en D-xilonolactona, una xilonolactonasa que cataliza la conversión de D- xilonolactona en

D-xilonato y finalmente una xilonato deshidratasa que hidrolisa el D-xilonato a 2 ceto 3-desoxi- xilonato (Stephens y cols., 2007).

El intermediario 2 ceto-3 desoxi-xilonato cuando sigue la vía Dahms obtenemos piruvato, y por otro lado al seguir la ruta Weinberg se obtiene alfa cetoglutarato gracias a la acción de una alfa cetoglutarico semialdehido dehidrogenasa en presencia de NAD. En la figura 2 se muestra los pasos involucrados en esta ruta.

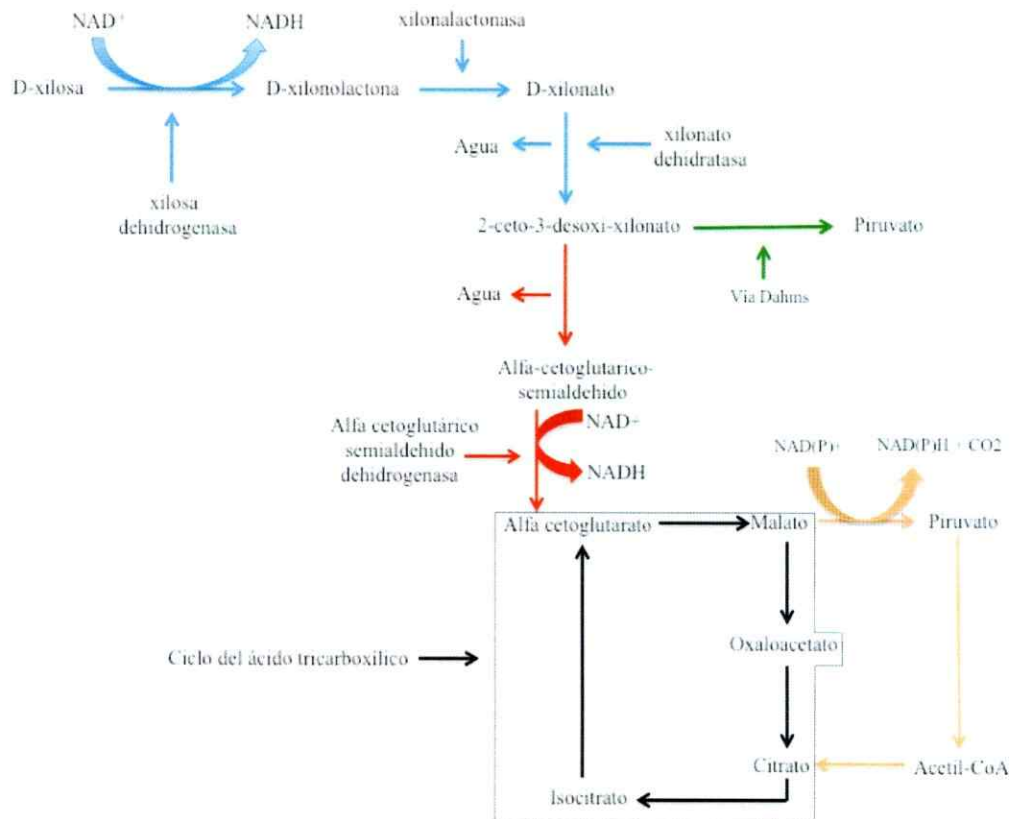


Figura 2.- Rutas de Weinberg y Dahms para la degradación de xilosa. Línea roja representa la ruta Weinberg desde el intermediario 2 ceto 3-desoxi-xilonato hasta alfa cetoglutarato. Línea verde indica la vía Dahms desde el intermediario 2 ceto 3-desoxi-xilonato hasta Piruvato. Extraído de Stephens y col., 2007.

Catabolismo de la Lactosa

Una vez que la lactosa es hidrolizada enzimáticamente por la acción de una beta galactosidasa en glucosa y galactosa esta última ingresa a la ruta de Leloir que involucra 4 pasos. Primero, la galactosa se fosforila en el C1 gracias al ATP, en una reacción mediada por la Galactokinasa dependiente de ATP. Segundo, la galactosa 1 fosfato uridiltransferasa transfiere el grupo uridilo de la UDP-glucosa a la galactosa 1 fosfato, para generar glucosa 1 fosfato (GIP) y UDP-galactosa por medio de la ruptura del enlace pirofosforilo de la UDP-glucosa. Tercero, la UDP-galactosa-4-epimerasa convierte la UDP-galactosa en UDP-glucosa. Esta reacción tiene asociado un NAD⁺, esto sugiere que la reacción involucra la oxidación y la reducción en secuencia del átomo C4 de la hexosa. Cuarto, la GIP se convierte en el intermediario glucolítico G6P por acción de la fosfoglucomutasa. (Scriver y cols., 1997).

Para esta ruta los blancos de interés se encuentran en los genes de Lactasa (LAC) o Beta galactosidasa que hidroliza la lactosa y una Galactokinasas (KGAL) que fosforila la galactosa a galactosa 1 fosfato. En la figura 3 se muestran los paso involucrados en esta ruta.

Considerando los antecedentes expuestos en el presente trabajo se analizaron diferentes especies de levaduras de nuestra colección en cuanto al crecimiento y fermentación de xilosa y lactosa. Por una parte se realizó fusión entre estas levaduras y *S. cerevisiae* con el objetivo de obtener derivados de *S. cerevisiae* capaces de utilizar y realizar la fermentación alcohólica de los azúcares mencionados. Además,

alternativamente se seleccionaron las levaduras con las mejores capacidades para identificar los genes claves para la utilización de xilosa y lactosa.

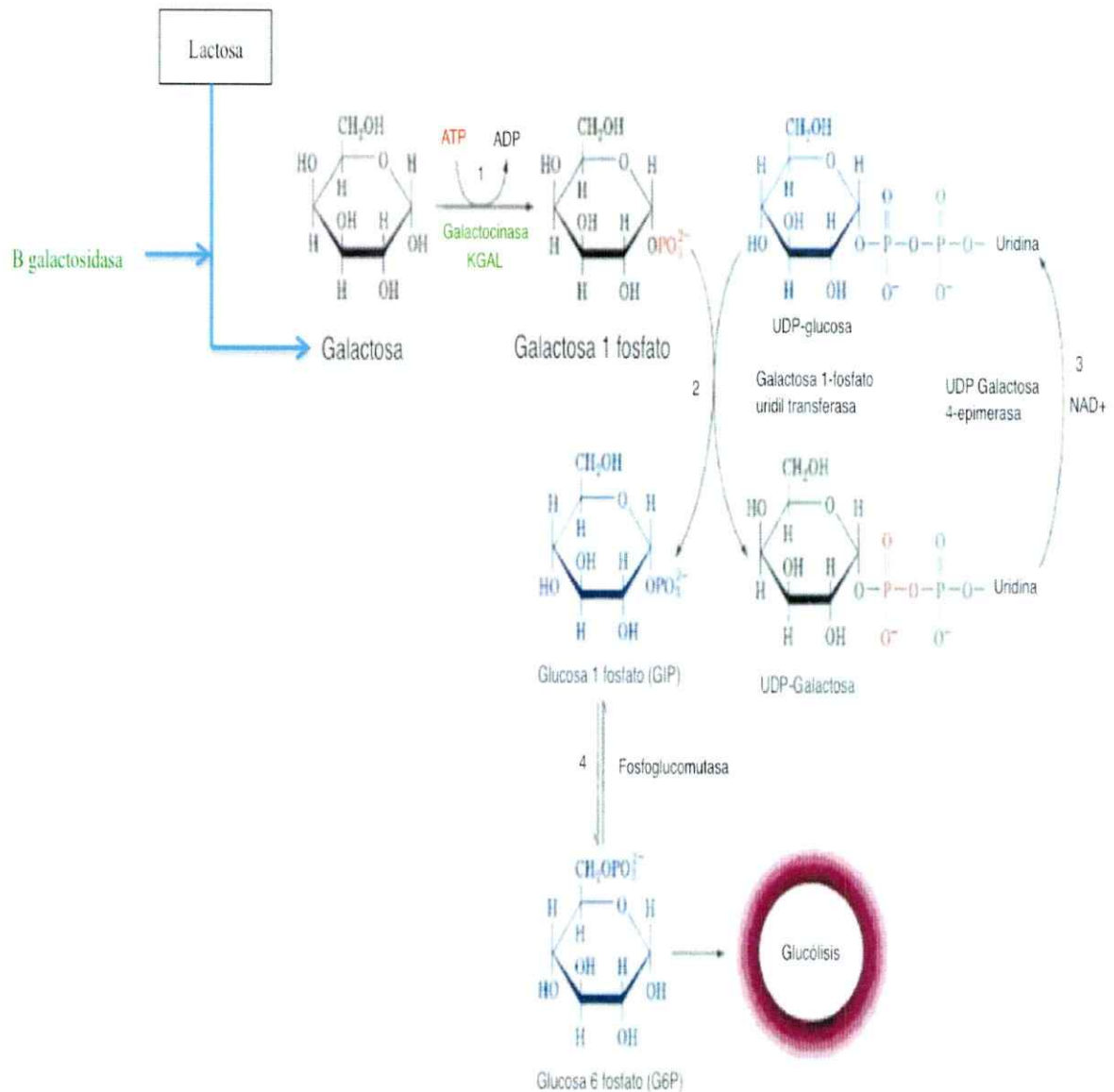


Figura 3.- Ruta catabólica de lactosa. En ella se involucran los cuatro pasos fundamentales 1.- La desfosforilación de un galactosa mediada por una Galactocinasa, 2.- Transferencia del grupo uridilo por la una Uridil-transferasa, 3.-En verde los principales genes de la vía a identificar.3.-Acción de una epimerasa que transforma la UDP-galactosa en UDP-glucosa y finalmente como 4 paso una fosfoglucomutasa convierte el intermedio GIP o glucosa 1 fosfati a glucosa 6 fosfato G6P.En verde los principales genes de la ruta catabólica de la lactosa.

HIPÓTESIS

La capacidad de levaduras antárticas para crecer con xilosa o lactosa, puede ser traspasada a *S. cerevisiae*, obteniendo derivados con capacidad de utilizar y fermentar dichas fuentes de carbono.

Hipótesis alternativa: Mediante el uso de partidores degenerados se podrá clonar parte de genes de utilización de xilosa o lactosa como fuentes de carbono que serían claves en la utilización de ingeniería metabólica de *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Generar y caracterizar derivados de la cepa *S. cerevisiae* S288c con la capacidad de asimilar y fermentar xilosa o lactosa mediante fusión de protoplastos. Clonar parcialmente desde levaduras antárticas parte los genes para la asimilación de lactosa y xilosa, candidatos para realizar ingeniería metabólica en *S. cerevisiae*.

Objetivos específicos

1. Caracterizar levaduras antárticas en su capacidad de crecer en xilosa o lactosa como única fuente de carbono y realizar fermentación alcohólica.
2. Obtener fusantes entre levaduras antárticas y *S. cerevisiae* S288c, que tengan la capacidad de utilizar xilosa o lactosa y que produzcan etanol.
3. Identificar los principales genes asociados al metabolismo de la xilosa y lactosa en las levaduras antárticas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Materiales

Microorganismos.

La lista de las especies, y origen de los aislados utilizados en este trabajo se detallan en la tabla 1.

Tabla 1.-Levaduras utilizadas en el presente trabajo.

Organismo	Especie	origen	Referencia
Levaduras	<i>Candida sake</i>	(A) a partir de una muestra de agua.	Carrasco y cols, 2012
	<i>Cryptococcus victoriae</i>	(A) a partir de muestras de suelo.	
	<i>Cryptococcus gilvescens</i>		
	<i>Dioszegia fristingensis</i>		
	<i>Rhodotorula laryngis</i>		
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	(A) a partir de muestra de suelo.	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 288c	Levadura de colección.		

(A) Levadura aislada desde la Antártica.

Reactivos Químicos.

Los componentes de los medios de cultivo y reactivos químicos, se adquirieron de Sigma Chemical, Merk y Difco Laboratorios. El antibiótico ampicilina e higromicina fueron adquirido de Sigma.

Enzimas

Las enzimas líticas Novozyma de *Trichoderma harzianum* y Zymoliasa-20T de *Arthrobacter luteus*, adquiridas en Sigma Chemical y Amsbio respectivamente.



Ácidos nucleicos.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron el marcador 1kb, 1kb plus, todos adquiridos de Invitrogen Life Science Technologies.

Kits.

Tanto para la extracción de DNA genómico total, como para la purificación de DNA plasmidial, se utilizaron respectivamente el kit “Wizard Genomic DNA Purification” y “Wizard® DNA Clean-Up System” ambos adquirido de Promega

2.2.-Método

2.2.1.- Preparación de protoplastos y fusión.

2.2.1.1.- Medios de cultivo.

En la preservación de las cepas de levaduras se utilizó el medio de cultivo YM (0,3 % extracto de levadura, 0,3 % extracto de malta y 0,5 % peptona) suplementado con 2 % p/v de glucosa. En los ensayos de curvas de crecimiento se usaron los medios mínimos SD (0,63 % YNB), Vogel y el medio ricoYM, suplementados con xilosa, lactosa o glucosa al 2% p/v. En las pruebas de fermentación alcohólica en campana Durham se utilizó el medio mínimo SD (0,63 % YNB), y el medio rico YM, suplementados con xilosa, lactosa o glucosa al 0,5% p/v y/o 2% p/v. Para los medios semisólidos se adicionó agar al 1,5 % p/v. En los casos que se necesitara se adicionó el antibiótico higromicina a 2 µg/ml.

2.2.1.2.- Preparación de protoplastos de *S. cerevisiae*

En la preparación de protoplastos, se cultivó la cepa de colección *S. cerevisiae* 288c en 100 ml de medio YM suplementado con 2 % p/v de glucosa, hasta la fase

exponencial de crecimiento (DO_{600nm} 0.6), y se colectaron las células por centrifugación a 1.500 x g por 5 min. Las células se suspendieron en 10 ml de solución A (1 M sorbitol, 25 mM de EDTA, pH 8, 50 mM de DTT), y se incubó por 3 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó por 5 min a 1.500 x g. Las células resultantes se lavaron con 10 ml de sorbitol 1M y el pellet celular se suspendió en 10 ml de 1 M de sorbitol, 1 mM de EDTA, 10 mM citrato de sodio, pH 5,8. A 1,6 ml de la anterior suspensión celular se adicionó 15 μ l de Zymoliasa 4,5U/ μ l y se incubó a 27 °C a 50 r.p.m por 1 h.

La formación de protoplastos se evaluó mediante la lisis celular observada al microscopio, luego de adicionar 1% de SDS, y el porcentaje obtenido se calculo usando la formula (DO_{800nm} final / DO_{800nm} inicial x100), para llegar a este resultado se procedió primero a adicionar 400 μ l de 5% SDS a 100 μ l de la solución de protoplasto y posteriormente se midió el espectro de absorción a una DO_{800nm} . Los protoplastos resultantes fueron centrifugados a 500 x g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se suspendió en 1 ml, 1M sorbitol como estabilizador osmótico.

2.2.1.3.- Preparación de protoplastos a partir de aislados antárticos.

En la preparación de protoplastos desde los aislados antárticos se procedió de manera similar que la cepa de colección *S. cerevisiae* 288c con la diferencia que *Cryptococcus gilvescens*, *Cryptococcus victoriae*, *Candida sake*, *Rhodotorula laryngis*, *Dioszegia fristingensis* estas fueron sometidos a una temperatura de incubación con Zymoliasa a 22°C entre 8 a 13 h y *Wickerhamomyces anomalus* fue sometida a un temperatura de incubación la misma enzima por 30°C por 1 h.

2.2.1.4.- Construcción del plasmidio pYES-2Hyg.

El vector pYES-2Hyg se obtuvo luego de clonar un cassette de resistencia a higromicina en el plasmidio pYES2 (Figura 4), para ello se efectuó una extracción plasmidial desde células de *E. coli* DH5 α previamente transformada con el vector pYES2. Posteriormente 70 μ l del producto de la purificación fueron digeridos con 10U/ μ l de la enzimas *Nco*I a 37°C durante 2 horas, luego de la digestión enzimática se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, para verificar la obtención de un plasmidio linealizado y cuya banda se escindió y purificó. Posteriormente, con la finalidad de obtener extremos romos en el plasmidio linealizado se procedió a utilizar 10 U de enzima Klenow, durante 15 minutos a 25°C y la inactivación de la enzima Klenow fue alcanzada mediante calentamiento a 75°C durante 20 minutos.

El producto de PCR obtenido luego de la amplificación del gen de resistencia a higromicina desde el vector pMet2-Hygro-CYC1 fue separado electroforéticamente en gel de agarosa al 1%, la banda se escindió y purificó. Luego con la finalidad de obtener extremos romos, ya que la amplificación por PCR se realizó con la enzima Taq polimerasa, se procedió a utilizar 10 U de enzima Klenow, durante 15 minutos a 25°C y la inactivación de la enzima Klenow se realizó a 75°C durante 20 minutos.

Finalmente, se ligó el cassette de resistencia a higromicina, obtenido por amplificación desde el vector pMet2-Hygro-CYC1, al plasmidio pYES2, para ello se utilizó una relación 3:1 (inserto: vector), utilizando T4 DNA ligasa de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La mezcla de reacción se dializó y se usó, para transformar *E.coli* DH5 α mediante electrotransformación. Las colonias obtenidas en placas

LB/higromicina fueron analizadas mediante PCR de colonias con los partidores de higromicina.

Los clones se cultivaron en medio LB amp, obteniéndose luego de la purificación, un plasmidio que poseía el cassette de Hyg denominado pYES-2Hyg.

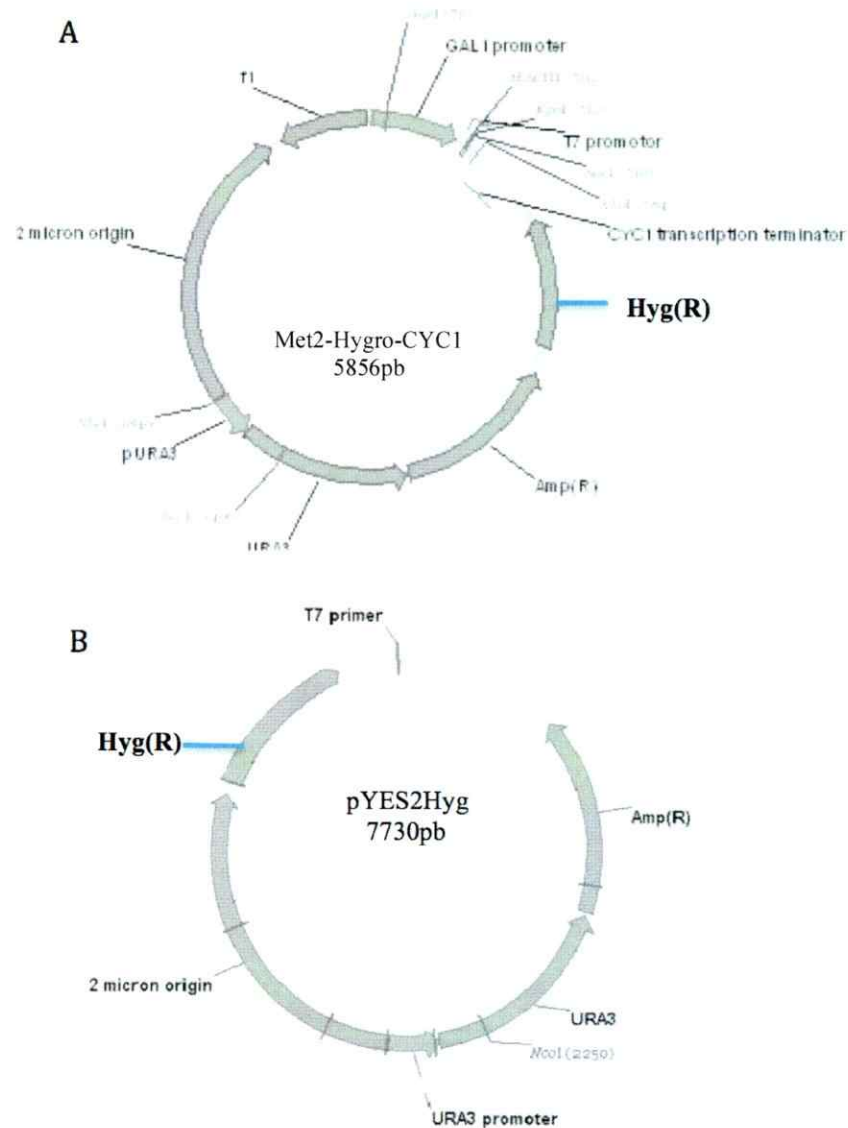


Figura 4.- Esquema de los plásmidos utilizados. A) El plasmidio Met2-Hygro-CYC1 se utilizó como molde para amplificar el gen de higromicina. B) El plasmidio pYES-2Hyg fue el vector resultante luego de insertar el gen de higromicina.

2.2.1.4.1.- PCR de colonia.

Luego de la electrotransformación de *E.coli DH5a* las colonias obtenidas en placas LB/higromicina fueron suspendidas directamente en una mezcla de PCR (12,5µl búffer taq 10X (200 mM TrisHCl, pH8,4, 500mM KCl), búffer BCP, dNTP's (10 mM de cada uno), 2 µl de mezcla de partidores (25 µM con los partidores de Hyg) y 0,4µl (1U) de Taq polimerasa); el volumen final se ajustó con 9,5 µl de agua libre de nucleasas. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystem) bajo las siguientes condiciones estándares: 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 45seg y 72°C por 3min y una etapa final de extensión a 72°C por 10 min. Los amplicones se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1 %

2.2.1.5.- Fusión de protoplastos y selección de fusantes.

Con el fin de verificar que la fusión había ocurrido, se mezclaron en un microtubo 100 µl y 600µl de los protoplastos provenientes de *S. cerevisiae 288Sc* y de la levadura antártica seleccionada respectivamente, además se adicionó a la mezcla anterior 1µg del vector pYES2Hyg. Posteriormente se centrifugó a 500 x g por 5 min y se suspendieron los protoplastos en 1ml de solución STC (33% de PEG(4000) y 0,6 M de sorbitol, 10mM Tris-HCl, 10mM de CaCl₂ pH 6,5) incubándose a 30 °C por 1 h con agitación orbital (95 r.p.m).

Luego se centrifugó a 500 x g y se procedió a lavar los protoplastos en 1M de sorbitol. La regeneración de fusantes se efectuó en 1 ml de medio de regeneración SD suplementado con glucosa(1mM CaCl₂, 1M sorbitol) e incubación por 1h a 30°C.

Alícuotas de 100 µl fueron sembradas en placas suplementadas con 2 ug/ml de higromicina y la fuente de carbono adecuada, incubándose a 30°C, hasta el desarrollo de colonias.

2.3.- Caracterización del crecimiento y fermentación alcohólica en xilosa y lactosa de los aislados antárticos.

Las levaduras Antárticas fueron crecidas en medios líquidos y sólidos YM, SD y Vogel, suplementados con xilosa o lactosa, e incubadas a la respectiva temperatura óptima de crecimiento. En el caso de medios líquidos se registró el crecimiento del cultivo mediante absorbancia a 600 nm y recuento viable se realizó en placa con YM,SD y Vogel con agar al 1,5 % p/v.

Por otro lado se evaluó la capacidad de la fermentación alcohólica a través de la acumulación de gases en campanas Durham, en medios líquidos suplementados con xilosa, glucosa o lactosa al 0,5% p/v y/o 2% p/v.

2.4.- Diseño de partidores.

Se descargaron las secuencias aminoacídicas de las distintas enzimas de la vía de utilización de xilosa o lactosa, disponibles en la base de datos del Centro Nacional de información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI): xilosa reductasa (*Xyl2*), xilitol dehidrogenasa (*Xyl3*), receptor kinasa (*RKI1*), ribulosa fosfato epimerasa (*RPE1*), transaldolasa (*TAL*), transketolasa (*TKL1*), transportador de xilosa (*HDX*), D-xilulokinasa (*XKS1*), B-xilosidasa (*PRK*), galactokinasa (*KGAI1*) y lactasa (*LACT*). Las secuencias aminoacídicas fueron alineadas usando ClustalW y se identificaron las zonas conservadas, con las cuales se realizó traducción reversa *in silico*. Los partidores

degenerados diseñados fueron evaluados mediante PCR *in silico* contra la base de datos NCBI.

2.4.1.1.- Extracción de DNA genómico.

Cultivos de 1 ml en fase exponencial de las levaduras Antárticas fueron centrifugados a 7.000 x g por 5 min y las células se suspendieron en 500 µl de solución TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5). Las células se mezclaron con 60 µl de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y se agitaron en vórtex por 3 min. Posteriormente se utilizó el kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega), para la extracción de DNA genómico de cada aislado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de DNA fueron analizadas en geles de agarosa al 1%, para verificar calidad y concentración éste.

2.4.1.2.- PCR.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl: 1 µl de DNA (aprox. 10 ng), 24 µl de “mezcla de PCR” (12,5µl buffer taq 10X (200mM TrisHCl, pH 8,4, 500 mM KCl), búffer BCP, dNTP's (10 mM de cada uno), 2 µl de mezcla de partidores (25 µM de cada partididor) y 0,4µl (1U) de Taq polimerasa); el volumen final de 14,9 µl se ajustó con agua libre de nucleasas. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystem) bajo las condiciones estándares, variando solo el tiempo de hibridación de 30 s a 45 s.

Los amplicones se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1 % en búffer TAE (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8,0) que contiene bromuro de etídio (0,5 µg/ml) y se fotografiaron en un transiluminador-UV.

2.4.1.3.- Purificación de DNA desde geles de agarosa.

Para tal efecto, se utilizó el kit Wizard® DNA Clean-Up System siguiendo las indicaciones del fabricante. Desde un gel de agarosa al 1%, se cortó con ayuda de un bisturí el producto de PCR. El trozo de agarosa que contenía el DNA se depositó en un tubo de 1,5 mL, se agregó “Membrane Binding solution” en una relación de 10 µl de solución por cada 10mg agarosa y se incubó a 60 °C por 10 min (o hasta que la agarosa se disolviera por completo). Luego se transfirieron 700 µL a una “SV Minicolumn”, se centrifugó a 16.000 x g por 1 min a temperatura ambiente y la columna se lavó dos veces con 700µL de búffer “Membrane Wash Solución”. Posteriormente se transfirió la “SV Minicolumn” a un tubo de 1,5 ml, se agregó 50 µl de agua libre de nucleasas y se incubó a temperatura ambiente por 1 min, finalmente se centrifugó a 16.000 x g por 1min. El análisis del DNA se efectuó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

2.4.1.4.- Preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α

Se inoculó 10 ml de medio LB amp con células stock de *E. coli* DH5 α , se incubó a 37°C por 16 h y se inoculó en 500 ml de LB para alcanzar una DO_{600nm} de 0,1. Se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,6 a 0,8. Se centrifugó a 5000 x g por 10 min, pellet se lavó dos veces con una solución de 10 % glicerol v/v y las células se suspendieron en el glicerol residual. La suspensión celular se alicuotó en volúmenes 1,5 ml con 50 µl de la células preparadas.

2.4.1.5.- Clonamiento de los productos de PCR en pBlueScript(PBS).

Los amplicones obtenidos fueron nuevamente amplificados utilizando la enzima Pfu Taq polimerasa(invitrogen) bajo los siguientes ciclos térmicos 94°C por 1 min,

seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 30 s y 72°C por 3min y una etapa final de extensión a 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron purificados desde el gel de agarosa usando el kit Wizard® DNA Clean-Up System, según las especificaciones del fabricante.

El vector pBluescript SK(+), fue previamente digerido con *EcoRv*. En un tubo de 1,5 ml se preparó un volumen de reacción de digestión de 20 µl totales (16 µl agua libre de nucleasas, 2 µl del buffer 10X, 1 µl de DNA(1ug) y 1µl de la enzima(5U/µl).Posteriormente se inactivo la enzima a 65°C por 10min y se dializó al igual que el producto de PCR. Tanto el producto de PCR, como el vector linealizado, se ligaron mediante la T4 DNA ligasa (invitrogen), en un microtubo de 1,5 ml se agregaron 16µl de agua libre de nucleasas, 2µl de buffer 10X T4DNA ligasa, 1µl (relación vector inserto de 1:3) y 1µl de T4 ligasas (1U/µl).

La mezcla fue dializada por 10 min contra agua y se mezclaron 3µl del ligado con 50 ul de *E.coli* DH5α electrocompetentes aplicándose un pulso de 2.500 volt, 25 µF, 200 Ohm, en un electroporador Gene Pulser Xcell. Las células ser suspendieron en 1 ml de medio LB, se incubaron 1 h a 37 °C y se alicuotó 100 µl que fueron sembradas en placas LB amp e incubadas e 37 °C hasta el desarrollo de colonias.

2.4.1.6.- Secuenciación automática de DNA y análisis de datos.

Se utilizó el servicio de secuenciación de Macrogen Inc (Seúl, Corea). Los datos de secuencias se analizaron en el programa Geneious Trial.

3. RESULTADOS

3.1.- Obtención de Fusantes

3.1.1.- Construcción del plasmido pYES-2Hyg.

Antes de realizar el protocolo de obtención de fusantes se procedió a construir un plasmidio denominado pYES-2Hyg con el objetivo de confirmar que existió fusión de protoplastos en los experimentos que se describen más adelante. Para ello se construyó un plasmidio con un cassette de resistencia a higromicina con el cual se transformó *E. coli* DH5 α . Los transformantes resistentes a higromicina fueron verificados y seleccionados por PCR colonias (Figura 5) y se obtuvo un amplicón de tamaño esperado de 1874 pb. Luego de verificados los respectivos clones, el plasmidio fue purificado y con él se procedió a transformar *S. cerevisiae* 288c comprobando que generó resistencia a higromicina en la levadura. La estrategia del uso del plasmidio pYES-2Hyg como marcador que indicó fusión entre los protoplastos de *S. cerevisiae* 288c y el respectivo aislado Antártico se detalla en la figura 6.

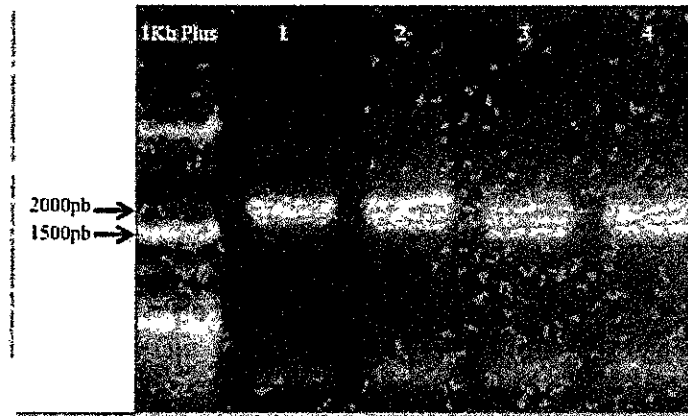


Figura 5.-Electroforesis de los amplicones correspondientes al inserto de higromicina. Los carriles del 1 al 4 representan los amplicones de aproximadamente 1800 pb obtenidos mediante PCR de colonias, a la izquierda el marcador de peso molecular 1Kb plus.

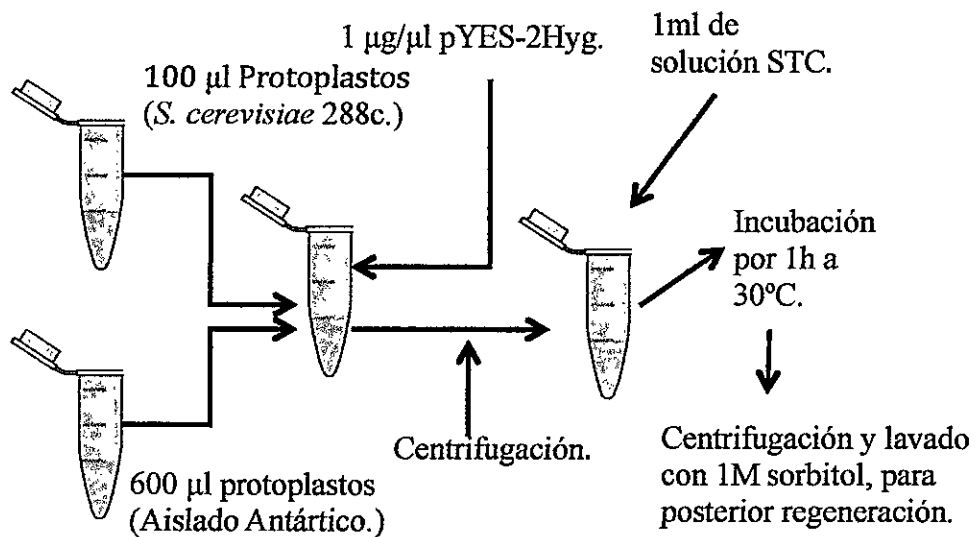


Figura 6.-Estrategia para confirmar la fusión de protoplastos. Para ello se utilizó el plasmidio pYES-2Hyg como marcador el cual se incluyó en una mezcla que contenía 100 µl de protoplastos de *S. cerevisiae* S288c y 600 µl de los protoplastos obtenidos desde aislados Antárticos, como se muestra en el figura. La mezcla se centrifugó y resuspendió en una solución STC y se incubó 1h a 30°C, para finalmente lavar y cultivar en el medio de regeneración de protoplastos

3.1.2.- Preparación, fusión y regeneración de protoplastos entre distintas levaduras.

Considerando que no existe un protocolo estándar, para la preparación de protoplastos desde aislados ambientales de levaduras antárticas, se efectuaron varios ensayos en que se evaluaron parámetros importantes en la generación de protoplastos: tratamiento con un agente reductor como el DTT, tiempo y temperatura de incubación con las enzimas líticas (Novozyma y Zymoliasa), pH, concentración del estabilizador osmótico, velocidad de centrifugación, concentración de PEG y de CaCl₂ y la proporción de protoplastos parentales (288sc:aislado antártico) usados en la fusión.

Como resultado del trabajo de estandarización, se determinaron las condiciones finales del protocolo, para la preparación de protoplasto en aislados de levaduras Antárticas. En relación a mejorar la degradación de la pared celular, se determinó que un pretratamiento químico por 3 min con DTT, previamente al uso de enzimas líticas, hace más eficiente el proceso de digestión enzimática a 22°C. Considerando, que algunos de los aislados antárticos tenían temperaturas de crecimiento muy por debajo de la recomendada para las enzimas probadas, Lysing Enzymes, de *Trichoderma harzianum* o Novozyma y *Lyticasa de Arthrobacter luteus* o Zymoliasa; lo que retardó en varias horas la degradación de la pared de aquellas levaduras que crecen a 22°C, resultó importante determinar que las temperaturas de 22°C y 30°C, para un período de incubación de a lo menos dos horas a un pH 5,8 , permitió obtener con la enzima Zymoliasa un mayor porcentaje de protoplastos bajo los parámetros antes mencionados.

En cuanto al uso de estabilizadores osmóticos, que evitan la ruptura de los protoplastos, a medida que estos se iban produciendo, se empleó sorbitol y KCl probándose concentraciones que variaron entre 0,3 a 0,8 M , siendo óptimo para la mayoría de los aislados sub-Antárticos una concentración final de 0,6M sorbitol

Otro parámetro importante observado fue la velocidad de centrifugación, ya que esta tuvo por finalidad la eliminación de los residuos y sedimentos propios de la digestión enzimática y química, probándose que sobre los 500 x g, los protoplastos se lisaron con facilidad y bajo los 400 x g el tiempo de centrifugación era más prologado, para obtener un pellet adecuado. Por otro lado se determinó que un 33% de PEG (polietilenglicol 4000) y 10mM de CaCl₂ disminuyó notablemente la lisis de protoplastos en el tiempo, además se evidenció que la relación entre protoplastos parentales 1:6 (288sc:aislado antártico), favoreció el manejo y la obtención de fusantes.

En relación al porcentaje de protoplastos generados, se determinaron los tiempos en los cuales se obtenían a lo menos un 50% de ellos previó a la lisis con SDS 1%; relación (OD800 final/OD Inicial) X 100, a una concentración de Zymolyasa de 4,5 U/μl. Se observó que la DO decae luego del tratamiento con SDS en especial en las cepas de *S. cerevisiae* 288 y *W. anomalus* las cuales formaron protoplastos a 1 h de tratamiento, en cambio *D. fristingensis* se obtuvieron a las 2 h desde iniciado el tratamiento. Por otro lado *C. sake* y *Rh. laryngis* tardaron a lo menos 3 h y *Cr. gilvescens*, *Cr. victoriae* demoraron entre 8 y 13 h respectivamente (Figura 7).

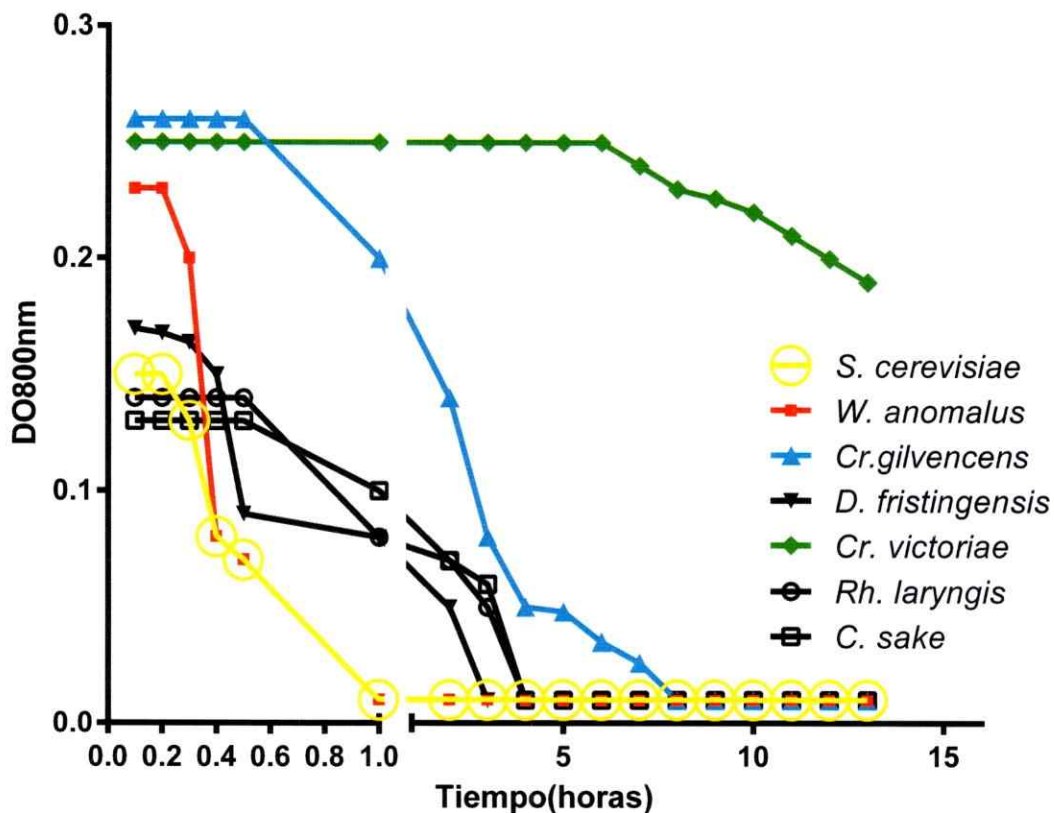


Figura 7.- Formación de protoplastos en presencia de Zymoliasa. Se analizaron los tiempos de incubación necesarios para la formación de protoplastos en los aislados antárticos determinándose que *S. cerevisiae* y *W. anomalus* tendían a formar protoplastos al cabo de una hora.

El protocolo descrito anteriormente se utilizó para la fusión entre *S. cerevisiae* y levaduras antárticas. Si bien se usaron varios medios para la generación y recuperación de fusantes, la selección aplicada fue estricta: 30°C, crecimiento sobre xilosa o lactosa como única fuente de carbono, y resistencia a higromicina, presente en el plásmido PYES2-Hyg. Una vez obtenidos los protoplastos, tanto de *S. cerevisiae* 288, como de los aislados antárticos, estos fueron sometidos al protocolo de fusión y regeneración,

obteniéndose posibles fusantes, entre los 5 a 10 días posteriores a la ejecución del protocolo (Tabla 2). Cabe señalar que la fusión entre las cepas 288sc y *Cr. gilvenscens*, entregó resultados negativos en la producción de fusantes a diferencia de las demás cepas utilizadas.

Se observó formación de fusantes luego de la fusión entre las cepas parentales 288sc/*W. anomalus*, 288sc/*C. sake*, 288sc/*D. fristingensis*, 288sc/*Cr. victoriae* y 288sc/*Rh. laryngis*, siendo negativa la formación de fusantes entre 288sc/*Cr. gilvenscens*. No obstante los fusantes obtenidos luego del proceso de regeneración fueron inestables, ya que al tratar de subcultivarlos en medios con xilosa o lactosa como principal o única fuente de carbono, en presencia de higromicina, no se obtuvo resultados positivos.

Tabla 2.- Resultado de la obtención de fusantes luego del proceso de regeneración.

Medios	<i>S. cerevisiae</i> 288sc					
	<i>W.anomalus</i>	<i>C. sake</i>	<i>D. fristingensis</i>	<i>Cr. victoriae</i>	<i>Cr. gilvenscens</i>	<i>Rh. laryngis</i>
Vogel ^L			+	+		
Vogel ^X	+	+			-	+
YM	+	+			-	+
YM ^L			+	+		
YM ^X	+	+			-	+
SD ^L			+	+		
SD ^X	+	+			-	+

Todos los medios fueron suplementados con higromicina. L, indica medio suplementado con lactosa y X, con xilosa. El signo + indica obtención de fusante luego del proceso de regeneración.

Después de varios intentos por obtener fusantes se llegó a la conclusión de que ésto no sería posible entre *S. cerevisiae* y las levaduras antárticas, no por problemas metodológicos ya que de acuerdo con nuestros resultados si ocurriría fusión entre ambas levaduras. Por tanto probablemente no exista compatibilidad genética entre las

levaduras usadas, riesgo que normalmente se corre con este tipo de metodologías parasexuales.

Una estrategia alternativa es realizar ingeniería metabólica, por ello en esta tesis se realizó la etapa inicial de esa meta que fue seleccionar las levaduras antárticas con las mejores capacidades de utilizar las mencionadas fuentes de carbono y analizar los genes claves pensando en expresión heteróloga en *S. cerevisiae*.

3.2.-Crecimiento en xilosa o lactosa y ensayo de fermentación alcohólica.

3.2.1- Análisis levaduras antárticas en su capacidad de crecer en lactosa.

Del total de levaduras antárticas analizadas a través de pruebas bioquímicas estandarizadas denominada galería API, que nos muestra una serie de actividades metabólicas para distintos carbohidratos, se observó que solo dos eran positivas para lactosa *Cr. victoriae* y *D. fristingensis*, por lo tanto éstas fueron cultivadas en placa con medio rico o mínimos ambos suplementado con lactosa al 2%, por cuatro días a 22°C, luego se procedió a analizar el crecimiento de estos aislados antárticos, en su capacidad de crecer en medio líquido suplementado con lactosa 2% a 22°C en agitación. Como resultado de tal ensayo se observó que *Cr. victoriae*, presentó un mayor crecimiento con respecto a *D. fristingensis* al cabo de 96 h (Figura 8). Además, se determinó que el mejor medio a suplementar con lactosa fue en primera instancia YM, seguida por medio mínimo Vogel.

Por otro lado, en las condiciones de crecimiento usadas la levadura *D. fristingensis*, presentó un alto grado de floculación en medio líquido a diferencia de *Cr. victoriae* (resultado no mostrado).

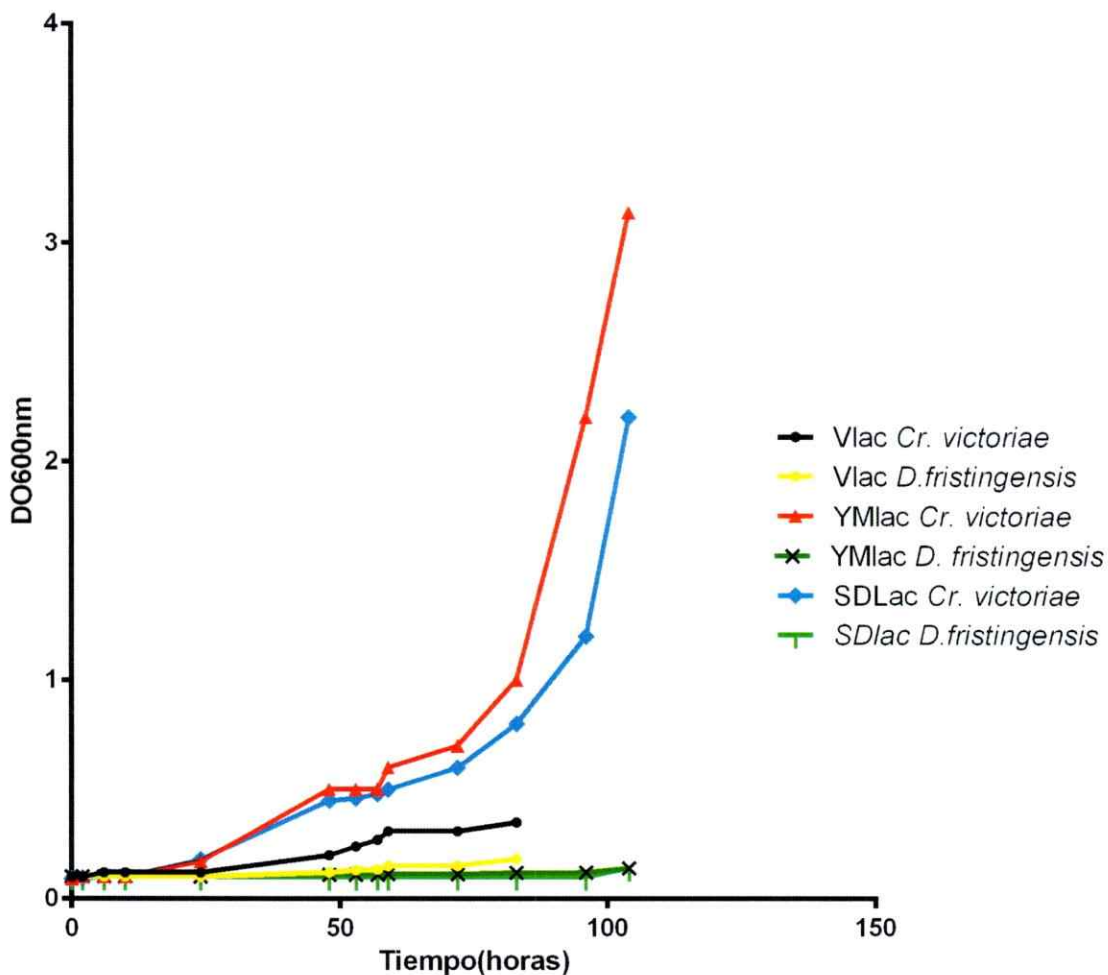


Figura 8.- Curvas de crecimiento de las levaduras *Cr. victoriae* y *D. fristingensis* cultivadas en medio mínimo (Vlac y SDLac) y medio rico (YMLac), ambos suplementados con 2% lactosa a una temperatura de 22°C con agitación.

3.2.2.- Análisis de levaduras antártica en su capacidad de crecer en xilosa.

De 23 aislados antárticos solo seis de ellos, presentaron un buen crecimiento en medio sólido rico o mínimo suplementado con xilosa al 2%. Por ende se analizó el crecimiento de estos aislados antárticos en su capacidad de crecer ahora, en medio líquido mínimo suplementado con xilosa 2% a 22°C por 24 h. Como resultado se

observó que *W. anomalus* presentó un mejor crecimiento en MM Vogel, suplementado con 2% xilosa que en MM SD suplementado con la misma única fuente de carbono.

En relación a los otros aislados antárticos estos no presentaron una curva de crecimiento que superara *W. anomalus* (Figuras 9-10).

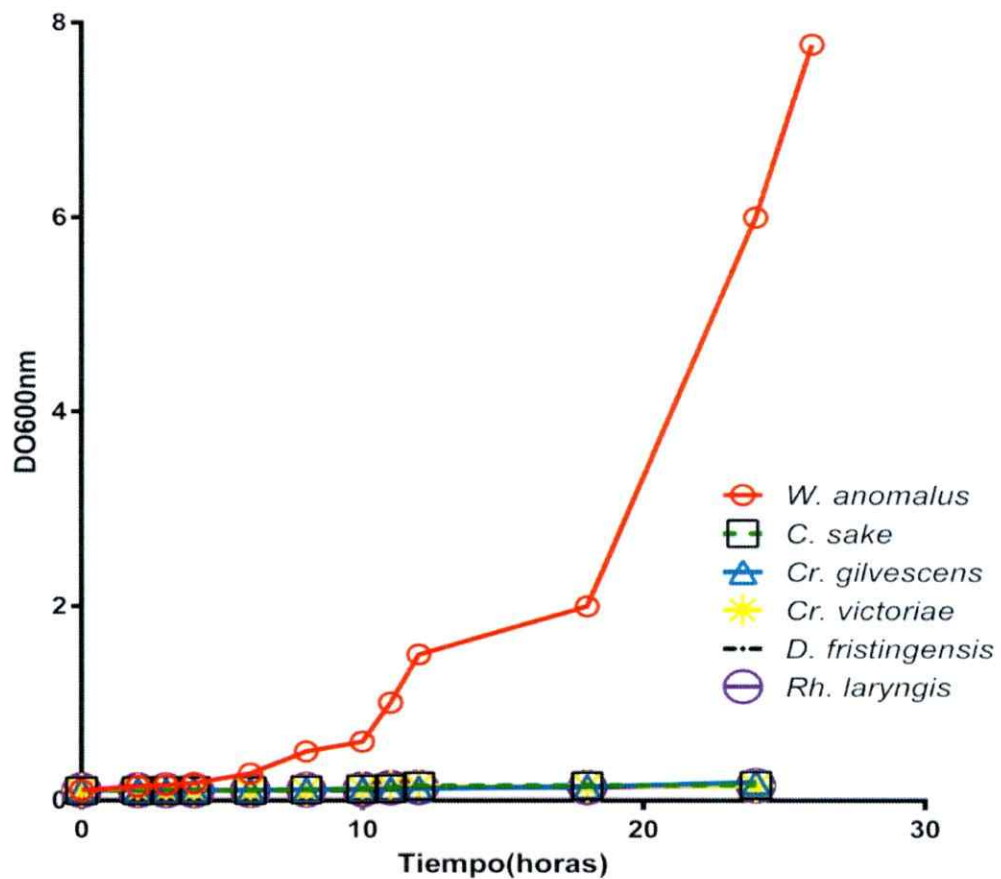


Figura 9.-Curva de crecimiento de las levaduras *C. sake*, *Cr. gilvescens*, *Cr. victoriae*, *D. fristingensis*, *Rh. laryngis* y *W. anomalus* en medio MMVogel 2% xilosa a 22°C con agitación.

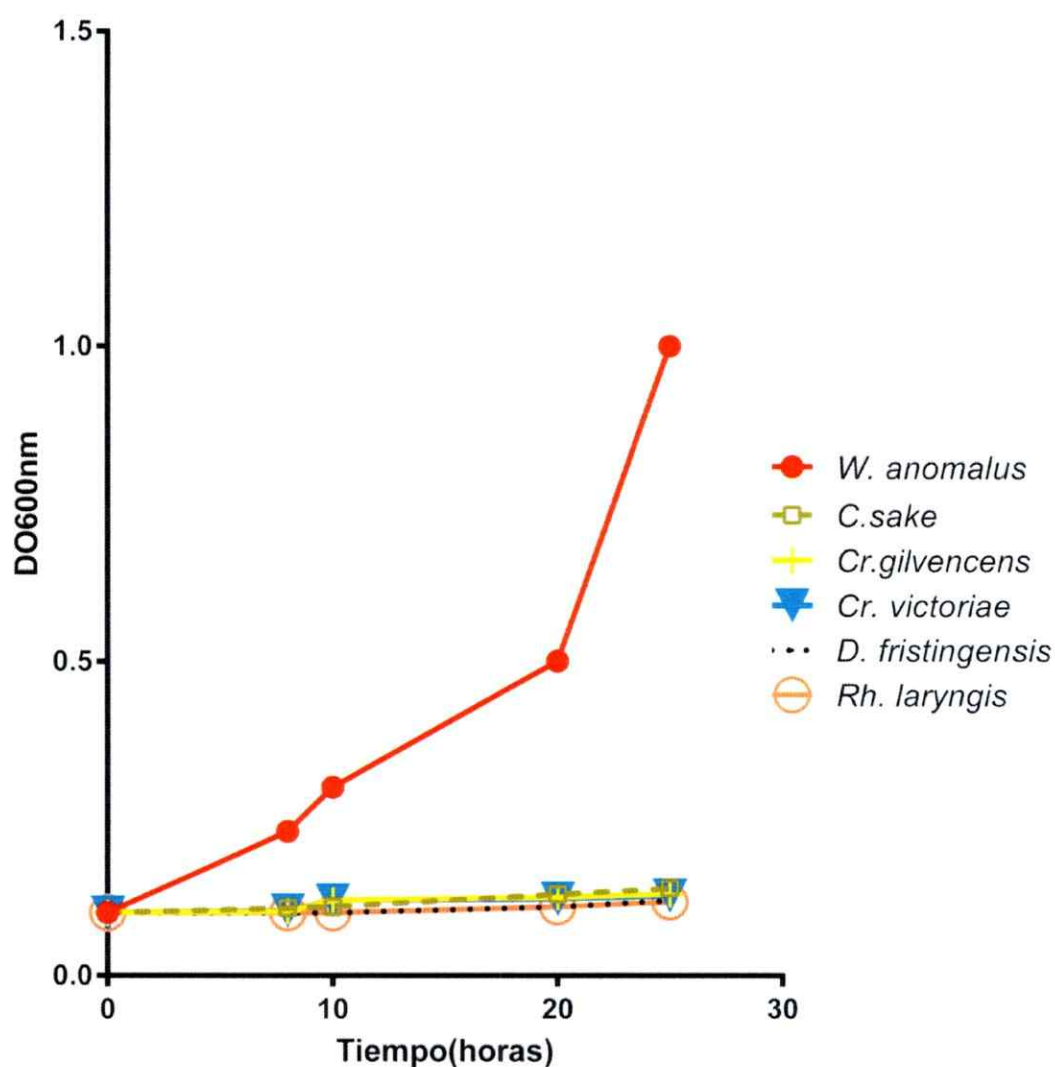


Figura 10.- Curva de crecimiento de las levaduras *C. sake*, *Cr. gilvencens*, *Cr. victoriae*, *D. fristingensis* y *Rh. laryngis* y *W. anomalus* en MM SD 2% xilosa a 22°C con agitación.

3.2.3- Ensayo de fermentación alcohólica en campana Durham.

Se evaluó la capacidad de dos levaduras antárticas, para fermentar xilosa o lactosa, en medio rico YM o medio mínimo SD, así como también medio rico o mínimo suplementado con 0,5% de glucosa. El método utilizado para ello fue la producción de CO₂ en campana de Durham.

Como se muestra en la tabla 3, ninguna de las levaduras *W. anomalus* y *Cr. victoriae* fue capaz de fermentar en los medio xilosa o lactosa, respectivamente. Por otro lado, se realizó el ensayo de fermentación adicionando bajas concentraciones de glucosa, para evitar la represión catabólica por este azúcar, sin embargo tampoco se observó resultados positivos.

Tabla 3.- Ensayo de fermentación alcohólica en campana Durham, en distintos medios ricos y mínimos suplementados con lactosa, xilosa, así como adición de glucosa al 5%.

Tubo	Medios	Presencia de gas
1	YM 0,5% glucosa	- <i>W.a</i>
2	YM 0,5% glucosa, 2% lactosa	- <i>Cr.v</i>
3	YM 2% lactosa	- <i>Cr.v</i>
4	YM 0,5 %glucosa - 2 % xilosa	- <i>W.a</i>
5	YM 2% xilosa;	- <i>W.a</i>
6	YM	- <i>W.a</i> /- <i>Cr.v</i>
7	SD 0,5% glucosa;	- <i>Cr.v</i>
8	SD 0,5 % glucosa-2% lactosa	- <i>Cr.v</i>
9	SD 2% lactosa	- <i>Cr.v</i>
10	SD 0,5% glucosa-2% xilosa	- <i>W.a</i>
11	SD 2% xilosa;	- <i>W.a</i>
C	YM 0,5% glucosa	+288Sc

-: Los resultados de las pruebas de fermentación en campana Durham fueron negativos tanto en *W. anomalus* (-*W.a*) como en *Cr. victoriae* (-*Cr.v*) tanto, para los medios mínimos y ricos, con xilosa, lactosa y glucosa.

3.3.- Identificación de genes asociados al metabolismo de xilosa y lactosa.

3.3.1.- Amplificación, purificación y secuenciación de genes de la vía de utilización de xilosa y lactosa en aislados antárticos.

Una de las estrategias usadas, para identificar parcialmente algunos de los genes que participan tanto en la vía metabólica de la xilosa y lactosa es mediante partidores

degenerados, que son diseñados a partir del consenso aminoacídico obtenido en alineamiento de las respectivas genes disponible en NCBI.

Como resultado del proceso anterior se diseñaron las parejas de partidores degenerados para Xilosa Reductasa (*Xyl1*(literatura), *Xyl2*), Xilitol Deshidrogenasa (*Xyl3*), Receptor Kinasa (*RK11*), Ribulosa fosfato epimerasa (*RPE1*), Transaldolasa (*TAL*), Transketolasa(*TKL1*),Transportador de Xilosa(*HDX*), D xilulokinasa (*XKS1*), B xilosidasa (*PRK*), Galactokinasa (*KG11*) y lactasa(*LACT*) (Tabla 4).

Una vez estandarizadas las distintas condiciones de PCR como temperatura de “annealing”, tiempo de extensión, concentración de DNA, MgCl₂ y control de amplificado inespecífico con un solo partidior, para cada uno de los partidores degenerados, se procedió a probar estos, en cada una de las seis cepas Antárticas trabajadas en esta tesis. Como resultado del PCR se obtuvieron amplicones con partidores degenerados en los distintos aislados antárticos (tabla 5).

Tabla 4.- Partidores degenerados.

Gen blanco	Nombre partidor/Secuencia (5'-3')	Tamaño de amplicon esperado(pb)
Xilosa reductasa	Xyl1aF GGTYYTTYGGMTGYTGGAARSTC	600
	Xyl1bR AAWGATTGWGGWCCRAAWGAWGA	
Xilosa reductasa	Xyl11F GATTAYGGTAAAYGAAAARGAAGTT	453
	Xyl11bR TTGTTGYAARTAWGGATGATGTTC	
Xilitol deshidrogenasa	Xyl1HaF CAYGGTAGAATHGGTGGTTTYGTH	795
	Xyl1HbR GGTCWTTYAGATAYTCWTTYGGTTTY	
Beta xilosidasa	Xyl13aF CAACAYTAYACHAARACHCCWGAA	1263
	Xyl13bR CTYTTACCYAATCTDATYTTTTTC	
Xilokinasa	XKS1aF TAYTTRGGTTTYGATGTTTCWACW	453
	XKS1bR TTCYTTWGCWGTWGAATGATCTTG	
Transketolasa	TKL1aF GCWAAATCWGGTCATCCWGGTGCW	1383
	TKL1bR WGTTCATWGGTTGATGWGTWGG	
Ribulosa fosfato epimerasa	RPEaF CCWTCATATTTTRGCTTCTGATTY	396
	RPEbR WGGWGTACCWGGYTTAATWGCACA	
Receptor Kinasa	RPEKaF ATTCWGGTATTGTTATTGGTTGT	816
	RPEKbR AACAAACACCRAAWGARTAAACATC	
Transaldolasa	TAL1aF AGAGTTTTRATTAARATTGCWTCW	159
	TAL1bR AACRAAWGGWGAATYAAWGTAAC	
Transportador xilosa	HDXaF TCWTGGAGATTRCCWTRTTYATT	843
	HDXbR TTCYAATTCACCACCYTTWGTTC	
Lactasa	LACT1aF TTRTGGTTRCAAATGTRTGYCCW	987
	LACT1bR TTCYAATTCCTCYAAWGTTC	
Galactokinasa	KLGal1aF ATHGGTGAACAYATHGAYTAY	500
	KLGal1bR RTARTTDGTWGGDGGDGTTCRTG	

Tabla 5.-Tamaño de los amplicones, obtenidos con los partidores degenerados para cada probable gen, en cada uno de los aislado antárticos.

Gen blanco	Tamaño de Amplicones obtenido (pb)	Aislados Antárticos positivos para los partidores degenerados
KGAI	2000pb	<i>D. fristingensis</i>
		<i>Cr. gilvescens</i>
	500pb	<i>C. sake</i>
		<i>W. anomalus</i>
		<i>Rh. laryngis</i>
HDX	1200pb	<i>Cr. victoriae</i>
	750pb	<i>C. sake</i>
	450pb	<i>W. anomalus</i>
	650pb	<i>Cr. gilvescens</i>
	550pb	<i>Cr. victoriae</i>
XKSI	650pb	<i>Rh. laryngis</i>
TKL1	750pb	<i>Rh. laryngis</i>
	1200pb	<i>Cr. victoriae</i>
RPE1	450pb	<i>C. sake</i>
	450pb	<i>W. anomalus</i>
	450pb	<i>Cr. gilvescens</i>
	450pb	<i>Rh.laryngis</i>
Xyl	450pb	<i>W. anomalus</i>
	450pb	<i>C. sake</i>
TAL	180pb	<i>W. anomalus</i>
	550pb	<i>Rh.laryngis</i>

Si bien, se obtuvieron amplificadas para KGAI en *Cr. victoriae*, *Cr. gilvescens*, *C. sake*, *W. anomalus* y *Rh. laryngis* éstos no fueron reproducibles, para confirmar por secuenciación (Figura 11).

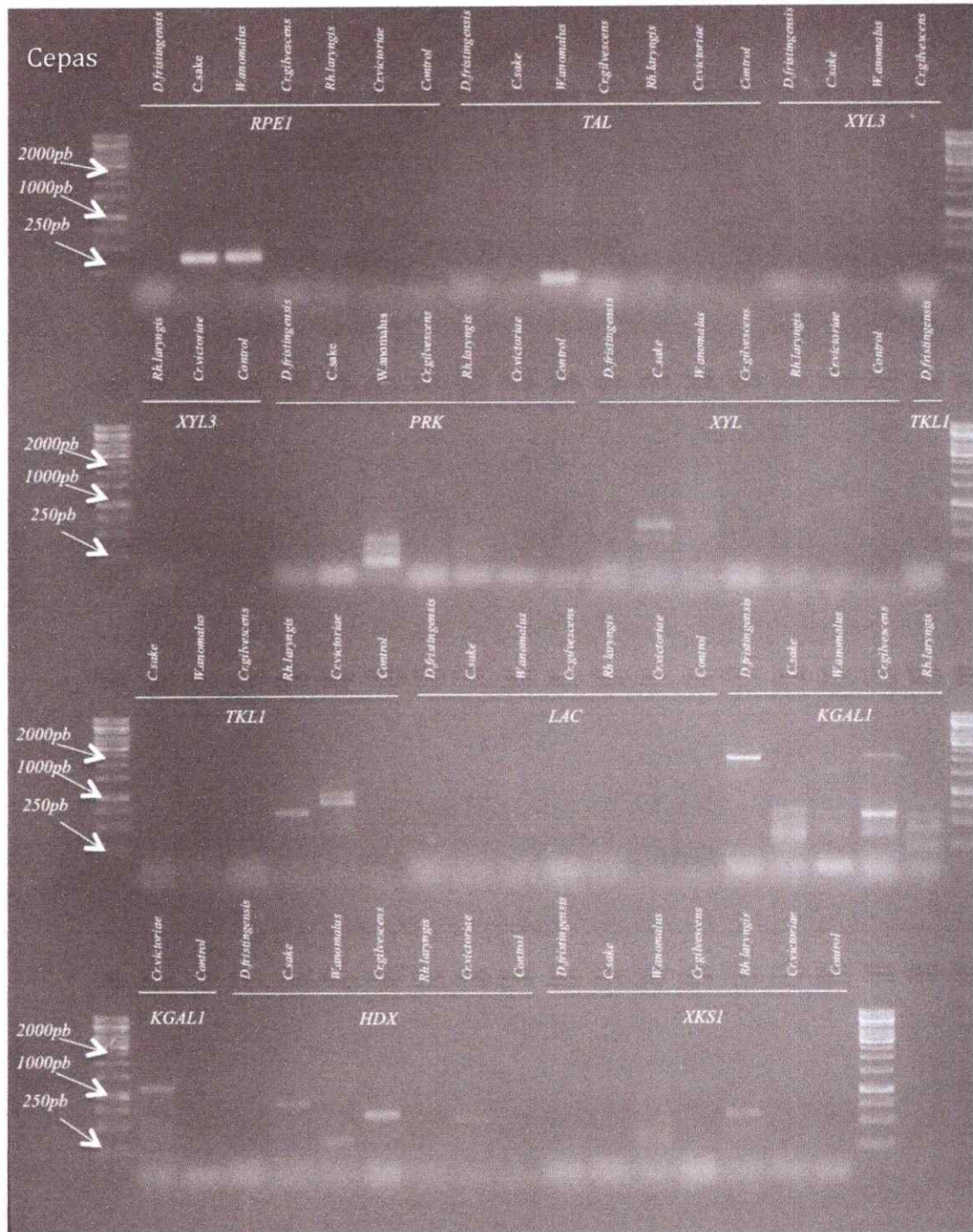


Figura 11.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra los amplicones obtenidos con partidores degenerados. Se muestra los amplificadas para *RPE1*, *TAL*, *Xyl3*, *PRK*, *Xyl*, *TKLI*, *LACT*, *KGAL1*, *HDX* y *XKS1*. En la parte superior del gel se indican las cepas probadas *D. fristingensis*; *C. sake*; *W. anomalus*; *Cr. gilvescens*; *Rh. laryngis* y *Cr. victoriae*.

Al clonar en el vector pBlueScript y secuenciar cada uno de los amplicones, obtenidos con los partidores degenerados se identificaron algunos genes de la vía de utilización de lactosa (tabla 6). Posteriormente se procedió a diseñar partidores específicos (Tabla 7), con las secuencias que exhibieron un “hits” con alta cobertura y porcentaje de identidad (Tabla 6) con el fin que en futuros experimentos para “caminar” sobre el DNA para obtener la secuencia completa del gen y/o cDNA.

Tabla 6.-Análisis mediante Blastx de los distintos amplicones clonados en pBlueScript, relacionados con la vía de utilización de xilosa.

Aislado	(pb) ^a	Cobertura aminoacídica;%I identidad	E-value	Blastx(Genbank) ^b	Genes
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	490	122/162(75%)	5E-64	NADPH-dependent D-xylose reductase [<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>]	<i>Xilosa Reductasa</i>
	190	38/40(95%)	1E-18	Sugar transporter [<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>]	Transportador xilosa
	158	29/36(81%)	5E-08	Transaldolase, enzyme in the non-oxidative pentose phosphate pathway [<i>Komagataella pastoris</i> GS115]	<i>Transaldolasa</i>
	180	32/46(70%)	6E-12	Ribulose-phosphate - epimerase, cytosolic [<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>]	<i>Ribulosa fosfato 3-epimerasa.</i>
	457	28/76(37%)	2E-05	Protein BN7 2642[<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>]	<i>KSI</i>
	250	52/83(63%)	7E-28	Protein BN7 2642	<i>TKL1</i>
	178	22/48(46%)	3E-04	ATP dependent helicase HrpA. <i>E.coli</i>	<i>Xyl1</i>
	322	37/61(61%)	1E-16	Hipotetical protein. <i>Candida galbrata</i>	<i>Xyl2</i>
	1263			NR	<i>Xyl3</i>
	816			NR	<i>PRK</i>

a : Largo secuencia nucleotídica.

b : Nombre de la proteína que presenta el mayor porcentaje de identidad.

NR : No registraron homología.

En la siguiente tabla se observan los partidores específicos diseñados a partir de la secuencia obtenida con los partidores degenerados. El nombre del partidor con su respectiva orientación (F (directo) y R(reverso)), secuencia nucleotídica , Tm, %G+C y el tamaño del amplicon esperado.

Tabla 7.- Partidores específicos.

Gen de las enzimas	Partidor	Secuencia 5' 3'	Tm	G+C	Tamaño esperado
Xilulokinasa	KSI 1F	GTTCGGCTGCGGATGCGGTA	62,8	65	457
	KSI 1R	AGAGGGGATTTGTGCGCCGAC	61,9	62	
Ribulosa fosfato 3 epimerasa	PB56F	AGGTGCCAAAGCTGATTGGCTACA	61,1	50	180
	PB56R	ACCCATTTTTCAGGTTTCAGCAACCA	59,5	44	
Transaldolasa	RPE2F	CTACTTATGAAGTATTCAAGCTGC	53,6	40	158
	RPE2R	CTTCAGCACATGCAACAGCTT	56,5	47,6	
Transketolasa	TKL2F	TTGTGATTATGGAGCCTGCAA	54,7	42,9	250
	TKL2R	TCCATGCTACTTGTGCCCTC	57,2	55	
Xilosa reductasa	xy11F	GCAGCTCCAACACTACAGGCGGT	62,1	61,9	178
	xy11R	CACCTGAAGCTGGTTGTGCTGA	59,9	54,5	
	xy12F	AGAGGGAAGGAATGGTGGTCGTGT	61,9	54,2	327
	xy12R	TCGGCTGTTGGAAGGTCACCA	61,2	57,1	
	xy124F	AGAGGGAAGGAATGGTGGTCGTG	60,8	56,5	
	xy124R	TCGGCTGTTGGAAGGTCACCA	61,2	57,1	
	xy1B1F	CGAAAAGGAAGTTGCAGCTGAACAAGT	59,9	44	490
	xy1B1R	GGCAGCTGGTTTAATTTTGGCACC	59,6	50	
Transportador de xilosa	xy1A13F	AGCTGAGGCAACAGTCTTGTCTT	58,9	44	193
	xy1A13R	TGGTGCCACTGGTCAAGGTTGT	61,5	54,5	

Como se observa en la (Figura 12), al usar como molde, para la reacción de PCR, DNA de *W. anomalus*; ya que fue la cepas que presentó mayor número de amplicones para los posibles genes de xilosa, se obtuvieron amplificados específicos para: Ribulosa fosfato 3-epimerasa (180 pb), Transportador xilosa (190 pb), una xilosa reductasa (490 pb) y una transaldolasa (158 pb).

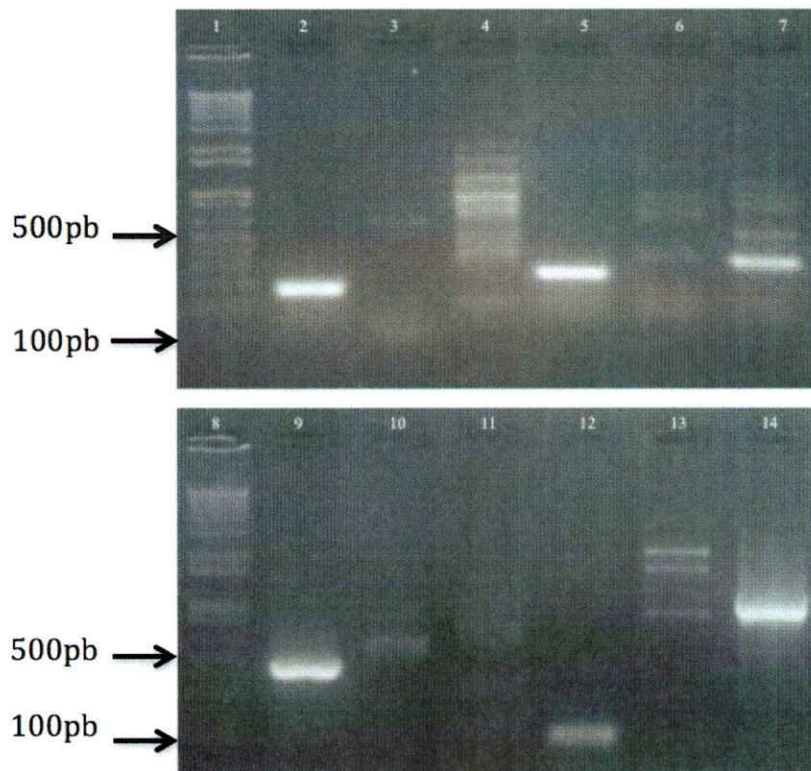


Figura 12.- Amplicones obtenidos al usar partidores específicos sobre ADN molde de *W. anomalus*. En el carril 1 y 8 estandar de peso molecular 1KbPlus, carril 2 Ribulosa fosfato 3-epimerasa, carril 5 Transportador de Xilosa, carril 9 Xilosa Reductasa, carril 12 Transaldolasas. Los carriles 3-4,6-7,10-11 y 13-14 controles con uno solo partidore ya sea directo o reverso.

Por otro lado para los genes de lactosa se variaron las concentraciones de DNA, dNTPs, partidores, y *Taq* polimerasa, además el tiempo de duración de las distintas etapas del programa de PCR, pero no se logró reproducir el amplicón obtenido originalmente (Figura 11). Este resultado sugiere que el partidore diseñado no es buen candidato, para identificar el gen más importante de la ruta de la lactosa. Por lo tanto, se evaluó con los partidores descritos previamente en eucariontes superiores y hongos filamentosos, pero tampoco fue posible la obtención de amplicados.

Para verificar que los partidores específicos diseñados, habían efectivamente amplificado alguno de los cuatro principales genes de la vía de utilización de xilosa en *W. anomalus*, se efectuó un análisis de secuencia. En ellas se obtuvieron “hits” con alta cobertura y porcentaje de similitud, como se observa en la tabla 8 logrando valores bastante altos en *RPEI*, *TAL*, Transportador de xilosa y una Xilosa reductasa.

Tabla 8.-Análisis mediante Blastx de los distintos amplicones clonados en pBlueScript, de la vía de utilización de xilosa.

Aislado	(pb) ^a	Cobertura aminoacídica; %Identidad	E-value	Blastx(Genbank) ^b	Genes
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	490	122/162(75%)	5E-64	NADPH-dependent D-xylose reductase [<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>]	<i>Xilosa Reductasa</i>
	190	38/40(95%)	1E-18	Sugar transporter [<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>]	<i>Transportador de xilosa</i>
	158	29/36(81%)	5E-08	Transaldolase, enzyme in the non-oxidative pentose phosphate pathway [<i>Komagataella pastoris</i> GS115]	<i>Transaldolasa</i>
	180	32/46(70%)	6E-12	Ribulose-phosphate 3-epimerase, cytosolic [<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>]	<i>Ribulosa fosfato 3-epimerasa</i>

a: Largo secuencia nucleotídica.

b: Nombre de la proteína que presenta el mayor porcentaje de identidad con la secuencia de los genes esperados.

4. DISCUSIÓN

En éste estudio, se evaluó la factibilidad de obtener fusantes mediante fusión de protoplastos, a partir de levaduras antárticas y *S. cerevisiae* con capacidad de producir etanol, y que puedan hacer uso de xilosa o lactosa, como única fuente de carbono,.

Considerando que no existe un protocolo estandarizado para la fusión de diferentes especies de levaduras, fue necesario la optimización de un protocolos que permitiera la generación y fusión de protoplastos de *S. cerevisiae* y diferentes especies de levaduras antárticas. Los principales parámetros evaluados fueron la digestión de la pared celular con distintas enzimas (Novozyma y Zymoliasa), tratamiento con detergentes, la temperatura y pH (Matsumoto y cols., 2001)

En relación a las enzimas líticas utilizadas, para la preparación de protoplastos, éstas tienen una temperatura óptima descrita, muy por encima de la temperatura ideal de crecimiento, para la levaduras antárticas trabajadas. Debido a esta causa, es que una digestión enzimática realizada a esta temperatura, podría afectar la viabilidad de las cepas antárticas. Por lo tanto, con el objetivo de hacer más eficiente la digestión a bajas temperaturas con las enzimas líticas usadas, se utilizó una preincubación con DTT, como pretratamiento, tiene la capacidad de desorganizar ligeramente la pared celular en levaduras, al reducir los enlaces disulfuro de las proteínas (-S-S-) a grupos sulfhidrilo (-SH) permitiendo desplegar completamente las manoproteínas que son uno de los componentes mayoritarios de la pared, mejorando considerablemente la digestión

enzimática y el porcentaje de esferoplastos producidos (Earlin y Bartels, 1966; Ganzazade A y cols., 1997; Aguilar U y cols., 2003).

En la evaluación de la dos enzimas mencionadas mas arriba, se determinó el rango de pH y T° necesarios para lograr la liberación de los protoplastos, siendo el preparado Lysing Enzymes, de *Trichoderma harzianum* o Novozyma el menos eficiente, ya que toleró un menor rango de pH y temperatura, a diferencia de la *Lyticasa* de *Arthrobacter luteus* o Zymoliasa la cual además de poseer un mayor número de enzimas tales como liticasa, quitinasa, zymoliasa y gluculasa tiene un rango mayor de pH y temperatura, 4,7 a 6,5 y 22 a 27°C respectivamente.

Por otro lado, el preparado de Zymoliasa, se ha descrito en la preparación de esferoplastos en un mayor número de géneros de levaduras como: *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, , *Pichia*, *Pullularia*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, entre otras (Herrero y cols., 1987)

Luego de determinados los parámetros de digestión en *S. cerevisiae* se procedió a evaluar este protocolo, en los seis aislados antárticos escogidos, logrando reducir considerablemente el tiempo en que se liberaban los protoplastos, la preincubación con DTT fue fundamental ya que sin éste en el caso de las levaduras *Cr. victoriae* y *Cr. gilvescens*, se superaban las 24 horas, en especial, cuando la digestión se realizaba a 22 °C debido a que el preparado enzimático no estaba en su temperatura óptimo, con la consiguiente dificultades de sincronizar la obtención de esferoplastos con *S. cerevisiae*.

En cambio el protocolo, funcionó muy bien en *W. anomalus* ya que su temperatura de crecimiento es de 30 °C siendo favorable para el preparado de Zymoliasas.

Otro punto importante en la estandarización, fue determinar la concentración de KCl y sorbitol como estabilizadores osmóticos, ya que la función de éstos, es evitar la ruptura de los protoplastos, a medida que se producen, para ello se empleó finalmente sorbitol en los distintos ensayos, probándose una concentración que varió entre 0,3 a 0,8 M. (Bhojwanil y Razdan, 1996), siendo óptima, una concentración final de 0,6M, para la mayoría de los aislados antárticos.

Una vez generados los protoplastos se procedió con cautela ya que se deben eliminar los residuos y sedimentos por medio de centrifugación entre 50 a 500g debido a que los protoplastos se lisan con facilidad, aún con el estabilizador osmótico. Por otro lado para aumentar las posibilidades de originar heterocariones binucleados producto de la fusión se utilizó PEG (polietilenglicol) como agente fusógeno, considerando además que éste compuesto, también lisa los protoplastos, por lo que éstos deben ser lavados con una solución de CaCl_2 (Lindsey y Jones, 1992).

Una vez obtenidos los protoplastos tanto en *S. cerevisiae* como en las levaduras antárticas se procedió con el protocolo de fusión, proceso que está descrito como secuencial, ya que primero los esferoplastos entran en contacto, luego se producen los puentes citoplasmáticos y finalmente se induce la fusión, en este evento es importante compensar las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana, ya que a pH fisiológico los esferoplastos tienden a repelerse mutuamente y el uso de iones de calcio favorecen una leve agregación (etapa de adherencia en un punto). Por otro lado el PEG como agente fusógeno actúa como puente molecular promoviendo la adhesión y fusión (Bhojwanil y Razdan, 1996)

Importante es indicar que una fusión no solo depende de la neutralización de las cargas superficiales de la membrana y del agente fusógeno, sino que además de otros factores, como el genotipo y fundamentalmente las diferentes poblaciones de protoplastos que interactúan, (Zimmermann,1983) en el caso de los aislados antárticos se uso una relación de 1:6 (Sc288:aislado antártico) la que generó una mayor tendencia a fusionar y originar fusantes.

Los posibles fusantes fueron seleccionados bajo parámetros muy restrictivos, en medio mínimo xilosa o lactosa, hyg, temperatura 30°C y medio rico suplementado con xilosa o lactosa, hyg, T° 30 °C y un tiempo de regeneración de una semana. Como resultado se obtuvieron probables fusantes no obstante estos resultaron ser inestables ya que no se pudieron subcultivar en diferentes medios con xilosa o lactosa, según corresponda, como principal fuente de carbono. Los experimentos de fusión con cada especie se repitieron al menos 3 veces con cada una de las seis especies de levaduras, obteniéndose similares resultados.

Las razones biológicas que explican la tasa de éxito en la formación del híbrido y su estabilidad, están directamente relacionadas a la proximidad taxonómica de la cepas utilizadas, ya que la frecuencia de fusión intraespecífica generalmente varía entre 10^{-3} a 10^{-4} , mientras que para la fusión intergenérica presenta valores tan bajo como 10^{-6} a 10^{-7} (Pina y cols., 1986.) Además, es común que los híbridos sean mitóticamente inestables o sufran en el proceso pérdida de cromosomas, lo que resulta en una aneuploidía. Incluso especies relacionadas son más propensas a este efecto que aquellas que se encuentran estrechamente relacionadas (Attfield y Bell, 2003).

Generalmente, como resultado del proceso de fusión, los fusantes obtenidos contienen el genoma completo de uno de los parentales con algunos cromosomas extra de la segunda matriz, en consecuencia, el fenotipo y el genotipo resultante es muy

difícil de predecir, incluso es muy raro que se produzcan híbridos nucleares, siendo más factible la generación de cíbridos, en donde la fusión permite heredar con una mayor tasa, los rasgos citoplasmáticos, como por ejemplo algunos genotipos asesinos o mitocondriales en cuanto a la competencia respiratoria (Yamazaki y Nonomura, 1994).

Al no conseguir fusantes estables se procedió con una segunda estrategia, la que se basa en identificar dentro de las levaduras Antárticas seleccionadas, aquellas que con capacidad de realizar fermentación alcohólica, así como poder crecer en xilosa o lactosa como única fuente de carbono, y posteriormente en estas cepas identificar los principales genes asociado al metabolismo de las rutas antes mencionadas.

De los aislados antárticos *C. sake*, *D. fristingensis*, *Cr. victoriae*, *Rh. laryngis* y *Cr. gilvenscens*, no fueron capaces de crecer en medio con xilosa, como única fuente de carbono, esto debido a que según la literatura la vía de utilización de xilosa pueden estar sujetas a represión catabólica por glucosa cuando la concentración de ésta última es alta, lo que supone un impedimento, para el transporte y consumo de otras fuentes de carbono distintas a los represores, afectando fundamentalmente al metabolismo de otros azúcares (Matsumoto y cols., 1983). Por otro lado se alcanzó una biomasa importante cuando se cultivo *W. anomalus* en xilosa y *Cr. victoriae* en lactosa, siendo

esta dos cepas candidatas, para la búsqueda de genes de la vía de utilización de xilosa o lactosa.

En relación al proceso de fermentación alcohólica en *W. anomalus* y *Cr. victoriae* este ensayo fue negativo, pese a que se aportó glucosa al 0,5% con la finalidad de eliminar la represión catabólica, como para alcanzar cierta biomasa que permitiera el proceso fermentativo (Kumari y Pramanik, 2012)

Ahora bien, si usamos el modelo de *S. cerevisiae*, para explicar las razones por las cuales algunas levaduras no pueden usar xilosa o lactosa, en el caso de la primera fuente carbonada, estudios previos en *P. stipiti*, *P. heidii* y *C. shehatae* han establecido la implicancia de dos sistemas de importación de xilosa, uno de alta y otro de baja afinidad (Does y Bisson, 1989; Kilian y Vanuden, 1988; Lee W y cols., 2002) en el caso de *S. cerevisiae*, posee la vía metabólica completa (Batt y cols., 1986) y puede hacer uso de xilosa cuando se cultiva en medios complejos con múltiples fuentes de carbono (Van Zyl y cols., 1989). En este caso, está descrito que la xilosa ingresa por difusión facilitada a través de transportadores de hexosa de la familia *HXT* (Kruckerberg, 1996), pero en *S. cerevisiae* existe una familia de *HXT* con baja afinidad por la xilosa (*HXT5* y *HXT7*) y se requieren transportadores con mayor afinidad (Kotter y Ciriacy, 1993).

Si el transportador de baja afinidad permite que entre xilosa a la célula, ésta se reduce a xilitol por una xilosa reductasa dependiente de NADPH, el xilitol se oxida a xilulosa por una xilitol deshidrogenasa XDH, luego la xilulosa es fosforilada por una xiluloquinasa XK, para producir xilulosa 5 fosfato que se cataliza a intermediarios a través de la vía de la pentosa y luego dará como producto piruvato, por ende se

reconoce que *S. cerevisiae* tiene incapacidad de crecer en xilosa debido fundamentalmente a que la absorción de este carbohidrato es ineficiente (Kotter y Ciriacy, 1993). Por otro lado, se ha identificado la existencia de un desequilibrio redox en los dos primeros pasos del metabolismo de xilosa así como una actividad XK insuficiente lo que lleva a una vía de la pentosas ineficiente (Walfrids y cols., 1995). Esta ineficiencia en la vía de la pentosa se explica por el ciclado del poder reductor entre NADH/NAD y NADPH/NADP causal de la no utilización eficiente de la xilosa (Bruinenberg y cols., 1983), y el uso ineficiente de la vía PPP en relación a tres enzimas no oxidativas, la *TKLI* (transketolasa), *TAL* (transaldolasa), y también la ribulosa 5-3 fosfato epimerasa (Karhumaa, 2005).

En el caso de las levaduras antárticas se lograron identificar parcialmente los genes que codifican para: xilosa reductasa, transaldolasa, transportador de hexosa y una ribulosa 5.3 fosfato epimerasa en *W. anomalus* lo que explicaría que esta cepa presentara una mejor cinética de crecimiento en medio mínimo xilosa sin necesidad de utilizar inicialmente glucosa para evitar la represión catabólica.

En estudios anteriores, se han identificados los genes antes mencionados como los cuellos de botella que limitan la tasa de consumo de xilosa, incluyendo la lenta absorción de xilosa, la baja conversión de xilosa en xilulosa, y el flujo limitado de la vía de las pentosas fosfato. Se ha observado que la sobreexpresión de las enzimas descritas, podrían eliminar estos cuellos de botella (Kuyper y cols., 2005). Por otro lado las manipulaciones genéticas y la evolución adaptativa se puede aplicar para aumentar la tasa de consumo de xilosa. Por ejemplo, varios estudios mostraron que combinar las

manipulaciones genéticas como: introducción de xylA de *Piromyces*, sobreexpresión de XKS1 endógeno, RPE1, TAL, y TKL1 a la evolución adaptativa en medios de xilosa puede generar cepas que puedan hacer uso eficiente de xilosa (Zhou y cols., 2012; Shen Y y cols., 2012). Sin embargo, existen dos inconvenientes para estos estudios: primero la existencia de cepas haploides de laboratorio que fueron elegidos como hospederos para expresión heteróloga, que son consideradas generalmente no tan robusta como las cepas diploides industriales cuando ocurre la fermentación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica (Hahn y cols., 2007). Además se emplea la expresión de genes basado en plásmidos, los cuales son considerados relativamente inestables y no son integrativos en el genoma (Zhang y cols., 1996).

Aunque la integración en el genoma del gen que codifica para una xilosa isomerasa fue logrado por Tanino *et al*, las cepa haploide de colección obtenidas, solo contaban con la incorporación de algunos genes de la vía de fermentación de xilosa en levaduras (Tanino y cols., 2010; Runquist y cols., 2009).

En relación al total de levaduras aisladas en el continente sub-antártico solo dos cepas tenían la capacidad de usar lactosa *Cr. victoriae* y *D fristingensis* (Carrasco y cols., 2002). Esto coincide con la literatura en la que se especifica que el número de microorganismos que pueden utilizar la lactosa es limitado (Domingues y cols., 2010), ya que en hongos a menudo la utilización de lactosa es muy baja, existiendo dos alternativas, hidrolizar la lactosa y posteriormente incorporar glucosa y galactosa, o bien captar el disacárido e hidrolizarlo intracelularmente. *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* o *Fusarium graminearum* siguen la segunda estrategia, para la

utilización de lactosa, mientras que a especies como *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) y *Aspergillus niger* tienen la capacidad de secretar β -galactosidasa que hidroliza la lactosa en el medio extracelular (Seiboth y cols., 2007)

Como habíamos indicado anteriormente, las levaduras que tienen la capacidad de fermentar lactosa son escasas (Fukuhara, 2006) por ejemplo *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus* y *Candida pseudotropicalis*, pueden hacer uso de esta fuente de carbono debido a la presencia de una Lacto permeasa y una β -galactosidasa, no así en *S. cerevisiae* cepa que no puede asimilar lactosa, pero sí puede utilizar galactosa (Guimaraes y cols., 2008).

Ahora bien, tanto en *K. lactis* como en *S. cerevisiae* la vía de utilización de lactosa así como sus genes están altamente conservados y las diferencias han surgido como resultado de un proceso evolutivo en entornos diferentes: Si consideramos a *K.lactis* y *S. cerevisiae* la primera se ha adaptado al uso de lactosa, en cambio la segunda a glucosa, por lo que ambas levaduras tienen distintos modos de regulación frente a esta fuente de carbono, dando cuenta de las diferencias fisiológicas (Rubio, 2005; Guimaraes y cols., 2008).

En relación a la vía de utilización de lactosa en las cepas Antárticas, se observó la imposibilidad de amplificar los genes *LAC* y *Kgal*, con los partidores degenerados, esto se puede explicar por la alta degeneración y la baja cobertura de los partidores, así como a la lejanía filogenética entre las levaduras seleccionadas, para efectuar las secuencias aminoácidas consenso (Linhart y Shami, 2002; Guo X y cols., 2012). Además son regiones intergenicas muy extensas, incluso con partidores descritos en literatura,

especificos para tales secuencias no se obtuvieron amplicones reproducibles en los ensayos, pese a probar muchas de las condiciones de PCR.

5. CONCLUSIONES

1.- Las levaduras *W. anomalus* y *Cr. victoriae* pueden crecer utilizando xilosa y lactosa, como única fuente de carbono, medido como aumento de la biomasa, sin embargo ninguna fue capaz de fermentar los azúcares.

2.- Los fusantes entre las cepas de *S. cerevisiae* y levaduras antárticas no son estables probablemente debido a la incompatibilidad citoplasmática/genética.

3.- La levadura *W. anomalus* posee cuatro genes de la ruta de la xilosa, identificándose en esta vía una xilosa reductasa, un transportador de xilosa, una ribulosa fosfato 3-epimerasa y una transaldolasa.

6. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Uscanga, B y François, J.M. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**: 268-274.

Anuradh, G y Sandun, F. 2008. Performace of yeast mediated Biological fuel cell. *Int. J. Mol. Science.* **9**: 1893-1907.

Attfield, P y Bell, P. 2003. Genetics and classical genetic manipulations of industrial yeasts. *Top. Curr. Genet.* Vol. 2 J. H de Winde (Ed.) *Functional Genetics of Industrial Yeasts.* 1: 17-56.

Batt, C., Carvalho, S., Easson, D., Akedo, M y Sinskey, A. 1986. Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 549-53.

Bhojwanil, S y Razdan, M. 1996. Protoplast isolation and culture. Somatic hybridization and cybridization. Elsevier Amsterdam. **13**: 337-406.

Bruinenberg, P., Bot P, Van Dijken., J y Scheffers, W. 1983. The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 287-292.

Byron, C y Hung, L. 2007. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnol. Adv.* **25**: 425-441.

- Carrasco, M., Rozas, J., Barahona, B., Alcaíno, J., Cifuentes, V y Baeza, M.** 2012. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiology*. **12**:251
- Does A, Bisson, L.** 1989. Characterization of xylose uptake in the yeasts *Pichia heedii* and *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 159–64.
- Domingues, L., Guimaraes, P y Oliveira, C.** 2010. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose, whey fermentation. *Bioengineered Bug.* **1**:164-171.
- Earlin, A y Bartels, L.** 1966. Effects of blocking sulfhydryl groups and of reducing disulfide bonds on the acetylcholine-activated permeability system of the electroplex. *Bba-Mol. Basic. Acta*, **126**: 535-545.
- Eddy, A y Williamson, D.** 1957. Method of isolating protoplasts from yeasts. *Nature*. **179**: 1252-133.
- Fukuhara, H.** 2006 *Kluyveromyces lactis* a retrospective. *FEMS Yeast Res.* **6**: 323-324.
- Ganzazade, A., Sklyar, A., Nasibov, S., Sushkov, I., Shashkov, A y Knirel, Y.**1997. Structural features of sulphated chitosans. *Carbohydrate Polymers.* **34**: 113-116.
- Guimaraes, P., Parrou, J., Teixeira, J y Domingues, L.** 2008. Adaptive Evolution of a Lactose-Consuming *Saccharomyces cerevisiae* Recombinant, *Appl. Environ. Microb.* **74**: 1748–1756.
- Guo, X., Wang, R., Chen, Y y Xiao, D.** 2012. Intergeneric yeast fusants with efficient ethanol production from cheese whey powder solution: Construction of a

Kluyveromyces marxianus and *Saccharomyces cerevisiae* AY-5 hybrid. Eng. Life Sci. 12: 1–6.

Guzmán, B., Villalón, M., González, A y García, M. 2009. Regeneración de protoplastos *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* Obtenidos con los ácidos: tánico, fórmico y acético, Revista Cubana. Vol 21: 3-7.

Hahn, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer, M y Gorwa, M. 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74: 937–953.

Herrero, E., Sanz, P y Sentandreu, R. 1987. Cell Wall protein liberated by Zymolyase from several Ascomycetous and imperfect yeasts: J. Gen. Microbiol. 133: 2895-2903.

Jeffries, T y Jin, Y. 2000. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. Adv. Appl. Microbiol. 47: 221–68.

Karhumaa, K. 2007. Comparison of the xylose reductase-xylicol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Micro. Cell. Fact. 6: 5.

Kavanagh, K y Whittaker, A. 1996. Application of protoplast fusion to the non-conventional yeast. Enzyme Microb. Technol. 18: 45–51.

Kilian, S y Vanuden, N. 1988. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 545–8.

Kotter, P y Ciriacy, M. 1993 Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 776–83.

- Kruckeberg, A.** 1996. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. **166**: 283–92.
- Kumari, R y Pramanik, K.** 2012. Improved Bioethanol Production Using Fusants of *Saccharomyces cerevisiae* and Xylose-Fermenting Yeasts. Appl. Biochem. Biotechnol. **167**: 873–884.
- Kuyper, M., Hartog, M., Toirkens, M., Almering, M., Winkler, A., Van Dijken, J y Pronk, J.** 2005. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. FEMS Yeast Res. **5**: 399–409.
- Kuyper, M., Toirkens, M., Diderich, J., Winkler, A., Van Dijken, J y Pronk, J.** 2005. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. FEMS Yeast Res. **5**: 925–934.
- Laluce, C., Schenberg, A., Gallardo, J., Coradello, L y Pombeiro, S.** 2012. Advances and Developments in Strategies to Improve Strains of *Saccharomyces cerevisiae* and Processes to Obtain the Lignocellulosic Ethanol A Review. Appl. Biochem. Biotechnol. **166**: 1908–1926.
- Lee, W., Kim, D., Ryu, Y., Bisson, L y Seo, J.** 2002 Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **60**: 186–91.
- Lindsey y Jones.** 1992. Biología celular de la ingeniería genética. En Biotecnología vegetal agrícola, Capítulo 6. Editorial ACRIBIA, S.A., Zaragoza. 105-142.
- Linhart, C y Shami, R.** 2002. The degenerate primer design problema. Bioinformatic. **18**: 172–180.

Lopes, M., Gomez, J y Silva, L. 2009. Cloning and overexpression of the xylose isomerase gene from *Burkholderia sacchari* and production of polyhydroxybutyrate from xylose. *Can. J. Microbiol.* **55**:1012-1015.

Matsumoto, K. 2001. Híbridos somáticos. *Biotecnología Ciencia & Desarrollo*, pp. 26-28.

Matsumoto, N., Tshikawa, T y Oshima, Y.1983. Cyclic AMP may be not involved in catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence from mutants unable to synthesize it. *J. Bacteriol.* **15**: 898-900.

Pina, A., Calderon, I y Benitez, T. 1986. Intergeneric hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces fermentati* obtained by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 995–1003.

Rubio, T. 2006. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnol. Adv.* **24**: 212– 225.

Runquist, D., Fonseca, C., Radström, P., Spencer, M y Hahn, B. 2009. Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**: 123–130.

Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W y Valle, D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* MC Graw-Hill Comp. 1997.

Seiboth, B., Pakdaman, BS., Hartl, L., Kubicek, CP. 2007. Lactose metabolism in filamentous fungi; how to deal with an unknown substrate. *Fungal Biol. Rev.* **21**: 42-8.

Shen, Y., Chen, X., Peng, B., Chen, L., Hou, J y Bao, X. 2012. An efficient xylose-

fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained through adaptive evolution and its global transcription profile. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**: 1079–1091.

Stephens, C., Christen, B., Fuchs, T., Sundaram, V., Watanabe, K y Jenal, U. 2007 Genetic analysis of a novel pathway for D- xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **189**:2181- 2185.

Takuma, S., Nakashima, N., Tantirungkij, M., Kinoshita, S., Okada, H y Seki, T. 1991 Isolation of xylose reductase gene of *Pichia stipitis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **28**: 327–40.

Tanino, T., Hotta, A., Ito, T., Ishii, J., Yamada, R., Hasunuma, T., Ogino, C., Ohmura, N., Ohshima, T y Kondo, A. 2010. Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**: 1215–1221.

Van Zyl, C., Prior, B., Kilian, S y Kock, J. 1989 D-xylose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2791–2798.

Walfridsson, M., Bao, X., Anderlund, M., Lilius, G., Bulow, L y Hahn, B. 1996. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4648–4651.

Wouter, H., Toirkens, M., Wu, Q., Pronk, J y Van Maris, J. 2009. Novel evolutionary Engineering Approach for Accelerated Utilization of Glucose, Xylose, and

Arabinose Mixtures by Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 907–914.

Yamazaki, T y Nonomura, H. 1994. Inherent G418-resistance in hybridization of industrial yeasts. *J. Ferment. Bioeng.* **77**: 202–204.

Zhang, Z., Moo-Young, M., Chisti, Y. 1996. Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Adv.* **14**: 401–435.

Zhou, H., Cheng, J., Wang, B., Fink, G y Stephanopoulos, G. 2012. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **14**: 611–622.

Zimmermann, U y Scheurich, P. 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta.* **151**:26-32.

Zimmermann, U. 1983. Electrofusion of cells: principles and industrial potential. *Trends in Biotechnology.* **15**: 149-156.