

UCH-FC
Biotecnología
M 828
C 1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE
MANITOL EMPLEANDO TÉCNICAS DE
INGENIERÍA GENÉTICA EN *Saccharomyces
cerevisiae*”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

Fabián Ignacio Morales Polanco

2014

Santiago, Chile

Director del Seminario de Título: **Juan Asenjo de Leuze, Ph.D**



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

“PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE MANITOL EMPLEANDO TÉCNICAS DE INGENIERÍA GENÉTICA EN *Saccharomyces cerevisiae*”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

FABIÁN IGNACIO MORALES POLANCO

Dr. Juan Asenjo de Leuze

Director Seminario de Título

Dra. Barbara Andrews Farrow

Co-Directora

Dr. Victor Cifuentes Guzmán

Patrocinante

Comisión Evaluadora

Dr. Michael Geoffrey Handford

Presidente Comisión

Dra. Claudia Stange Klein

Evaluador

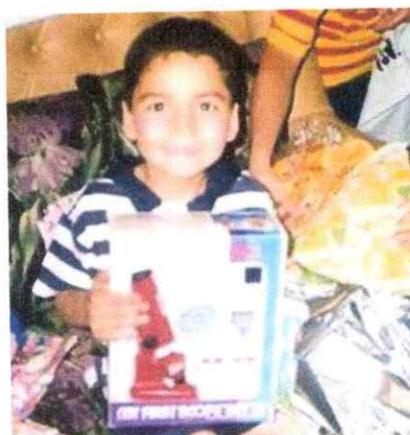
B. A. Andrews

Michael Handford

Santiago de Chile, 2 de Abril de 2014

“Nunca se ha logrado nada sin entusiasmo...”
Emerson

A mi bella familia.



Nací el 7 de marzo de 1988 en Rancagua, donde crecí y compartí con mi familia: mi padre: René Morales, mi madre: Genoveva Polanco y mis hermanas: Cathy y Valeria. Desde pequeño sentí un enorme interés por las ciencias, razón por la cual mis primeros regalos de Navidad fueron entre otros, un microscopio y telescopio. Mi enseñanza básica la cursé en el Colegio Infantes de O'Higgins, donde me destacué por mi proactividad y entusiasmo. La enseñanza media la cursé en el Colegio Quimahue y fue durante esos años que descubrí que mi interés vocacional estaba orientado hacia las ramas de química y biología. Al salir de cuarto medio no sabía bien qué estudiar, razón por la cual ingresé a la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, donde descubrí que no me agradaba mucho el trato con pacientes. Mi entusiasmo por las Ciencias aplicadas era tan grande, que ví en la biotecnología una enorme oportunidad para emplear el conocimiento científico a fin de generar/inventar nuevos productos y servicios que pudiesen mejorar la calidad de vida de las personas. De este modo ingresé con enorme motivación a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la misma universidad. Hoy me encuentro enormemente agradecido de lo que he aprendido en esta hermosa carrera, la calidad de los docentes y científicos que han aportado en mi formación es invaluable; la rigurosidad con la que he aprendido a llevar a efecto mis investigaciones es única, y cada día que pasa veo lo bien que hice en elegir esta carrera como mi profesión. La biotecnología no tan sólo me llena el corazón, sino que además me capacita en desafiar diferentes obstáculos, por muy difíciles que éstos parezcan. Finalmente, doy término a una larga etapa en la Universidad de Chile, y luego de mucho esfuerzo y dedicación, me siento orgulloso de lo que mis padres y yo pudimos lograr.

Cierro contento un ciclo repleto de maravillosas vivencias, experiencias y aprendizajes sin fin, que me han permitido al día de hoy obtener la Beca Conicyt para realizar mis estudios doctorales en la Universidad de Mánchester, Inglaterra.

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar quisiera agradecer a mi director de tesis, el Dr. Juan Asenjo, por darme la oportunidad de realizar mis ideas en mi propia investigación. A la Dra. Barbara Andrews, por motivarme día a día como científico y por confiar en mis experimentos. Quisiera agradecer también al profesor y decano de la Facultad de Ciencias el Dr. Victor Cifuentes por su incondicional apoyo y en especial, a la Ingeniera Nicole Werner por ser mi mentora y mi más grande apoyo científico. También me gustaría agradecer a la gente del CYBYB que aportó en que mis días en el laboratorio fueran más agradables: a Allison Leyton por los almuerzos, la confianza y nuestra bella amistad, a Trinidad Cortés por su hermosa energía, a Camilo Acuña por su increíble recibimiento, a Daniela Sandoval por sus consejos y su infinita ayuda en el laboratorio, a mis ayudadas Carol y Rocío por traerme la buena vibra con las ligaciones, a Elisa Barrientos por su cariño, a Camila Wilkens por los plásmidos que me facilitó y a José Duguet por creer desde el comienzo en mi investigación.

También me gustaría agradecer a la prof. C. Stange por formar parte de mi comisión evaluadora y por su cariño. Por otro lado, me gustaría agradecer con harto cariño al Dr. Michael H., quien me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio cuando era estudiante, escribió las cartas de recomendación más exitosas de mi vida y me ayudó más que nadie en la corrección de este trabajo. También quiero agradecer a mis "Peces": Valentina, Ester y Natalia, por todo el apoyo que nos brindamos durante la Universidad y por la hermosa amistad que hemos creado y que espero de corazón, siga creciendo. Me gustaría agradecer también a mis grandes amigos, a aquellos que han perdurado en el tiempo, gracias por apoyarme siempre y por creer infinitamente en mí: Daniela G., Ángela Cáceres, Yubitza R., Carolina C., Ignacio G., Natalia B., Jéssica A., Carolina P., Lilian R y todos los demás. Quiero agradecer en especial a Nicolás G. por haber llegado a mi vida cuando más lo necesité y por compartir estos momentos maravillosos conmigo.

Finalmente quisiera agradecer a mi familia por confiar en mí y por darme la posibilidad de estudiar esta hermosa carrera. A mi madre, por ser mi mejor amiga y por darme las fuerzas y el aliento suficiente para salir adelante en mis años de universidad; a mi padre, por creer en mí a ojos cerrados y por el enorme orgullo que siente cada vez que logro algo en la vida, a mi nana Georgina y mi tata René por tenerme el postre rico todos los domingos, a mis hermanas por amarme tanto y a mi abuela Genoveva que del cielo me manda las más bellas bendiciones. No los voy a defraudar.

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----------|
| INDICE DE CONTENIDOS..... | vi |
| INDICE DE TABLAS..... | viii |
| INDICE DE FIGURAS..... | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | x |
| RESUMEN..... | xiii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 <i>Demanda de combustibles – desafío global</i> | 1 |
| 1.2 <i>Biocombustibles</i> | 3 |
| 1.3 <i>Tercera Generación: Biocombustibles algales</i> | 5 |
| 1.4 <i>Macroalgas</i> | 6 |
| 1.4.1. <i>Algas pardas - Macrocystis pyrifera</i> | 8 |
| 1.5 <i>Producción de bioetanol a partir de azúcares de M. pyrifera</i> | 11 |
| 1.6 <i>Diseño de una estrategia de ingeniería genética</i> | 15 |
| 1.6.1 <i>Metabolismo del Manitol</i> | 15 |
| 1.6.2 <i>Búsqueda de riqueza genética</i> | 17 |
| 1.6.3 <i>Desbalance del equilibrio óxido-reducción</i> | 19 |
| 1.6.4 <i>Otras optimizaciones para la producción de bioetanol en levadura</i> | 21 |
| 1.7 <i>Antecedentes Metodológicos</i> | 22 |
| HIPOTESIS..... | 26 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 27 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 27 |
| 2 MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| 2.1 <i>Cepas, plásmidos y DNA genómico</i> | 29 |
| 2.2 <i>Oligonucleóticos y ácidos nucleicos</i> | 31 |
| 2.3 <i>Cultivo de microorganismos</i> | 37 |
| 2.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 37 |
| 2.3.2. <i>Escherichia coli</i> | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.3. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | 39 |
| 2.4 Purificación de ácidos nucleicos..... | 40 |
| 2.4.1 DNA plasmidial..... | 40 |
| 2.4.2 Extracción de DNA genómico..... | 40 |
| 2.4.3 Purificación de fragmentos de DNA..... | 41 |
| 2.5 Reacciones de PCR..... | 42 |
| 2.5.2 PCR de colonias..... | 43 |
| 2.5.3 PCR de elongación (OE-PCR)..... | 43 |
| 2.5.4 PCR recursivo y síntesis de cDNA..... | 44 |
| 2.6 Análisis de DNA..... | 45 |
| 2.6.1 Electroforesis en geles de agarosa..... | 45 |
| 2.6.2 Digestión con endonucleasas de digestión..... | 45 |
| 2.7 Transformación genética por electroporación..... | 46 |
| 2.7.1 Ligado de DNA..... | 46 |
| 2.7.2 Transformación de <i>E.coli</i> | 46 |
| 2.7.3 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> | 48 |
| 2.8 Curva de producción de etanol y cromatografía de gases..... | 50 |
| 2.8.1 Curva de producción de etanol de clones recombinantes en condiciones aeróbicas..... | 50 |
| 2.8.2 Producción de etanol de clones recombinantes en condiciones anaeróbicas..... | 51 |
| 2.8.3 Cromatografía de gases..... | 51 |
| 3. RESULTADOS..... | 53 |
| 3.1 Levantamiento y clonamiento de genes..... | 53 |
| 3.1.1 Amplificado y clonamiento de genes de <i>S. cerevisiae</i> S288c..... | 53 |
| 3.1.2 Amplificado y clonamiento del gen <i>noxE</i> de <i>L. lactis</i> | 54 |
| 3.2 Síntesis de cDNA del gen que codifica para un putativo transportador de polioles de <i>Verticillium albo-atrum</i> | 57 |
| 3.3 Construcción de módulos de expresión de genes de producción de bioetanol desde manitol para <i>S. cerevisiae</i> | 61 |
| 3.3.1 Amplificado e hibridación de fragmentos..... | 61 |
| 3.3.2 Clonado de módulos en vector pBluescript SK II..... | 67 |
| 3.4 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> | 69 |
| 3.4.1 Cepa resistente al antibiótico higromicina B..... | 69 |
| 3.4.2 Obtención de cepa productora de bioetanol a partir de manitol..... | 75 |
| 3.4.3 Sistema de transformación para cepa portadora de los genes MDH y <i>noxE</i> , y otras cepas..... | 82 |

| | |
|---|------------|
| 4. DISCUSION | 84 |
| 4.1 Levantamiento y clonamiento de genes..... | 84 |
| 4.1.1 Amplificación y clonamiento de genes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c. | 84 |
| 4.1.2 Amplificado y clonamiento del gen <i>noxE</i> de <i>L. lactis</i> | 85 |
| 4.2 Síntesis de cDNA del gen que codifica para un putativo transportador de polioles de <i>Verticillium albo-atrum</i> | 86 |
| 4.3 Construcción de módulos de expresión en <i>S. cerevisiae</i> | 87 |
| 4.4 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> | 90 |
| 4.4.1 Cepa resistente al antibiótico higromicina B..... | 90 |
| 4.4.2 Obtención de cepa productora de bioetanol a partir de manitol..... | 93 |
| 4.4.3 Sistema de transformación para cepa portadora de los genes <i>MDH</i> y <i>noxE</i> , y otras cepas. | 103 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 106 |
| 6. PROYECCIONES | 107 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 108 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1.- Composición diferencial de carbohidratos en macroalgas..... | 7 |
| Tabla 2.- Cepas mencionadas en este seminario de título..... | 29 |
| Tabla 3.- Plásmidos y DNA genómico utilizado en esta tesis. | 30 |
| Tabla 4.- Oligonucleóticos utilizados en este trabajo. | 32 |
| Tabla 5.- Resumen del clonamiento de genes realizados en esta tesis..... | 56 |
| Tabla 6.- Fragmentos amplificados para la construcción de cada módulo y partidores usados en cada reacción..... | 62 |
| Tabla 7.- Combinaciones de partidores usadas para la amplificación de fragmentos para cada transformación. | 71 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1.- Consumo mundial de energía entre 1987 y 2012..... | 2 |
| Figura 2.- Estructura orgánica del polímero de alginato..... | 9 |
| Figura 3.- Estructura orgánica del manitol | 15 |
| Figura 4.- Ciclo del manitol..... | 16 |

| | |
|---|----|
| Figura 5.- Sistema de co-transformación en <i>S.cerevisiae</i> empleado en este trabajo..... | 24 |
| Figura 6.- Esquema global de la estrategia de ingeniería genética para producir etanol empleando manitol como única fuente de carbono y energía..... | 25 |
| Figura 7.- Vector de clonamiento pBluescript II SK (+) | 31 |
| Figura 8.- Cromatografía de gases..... | 52 |
| Figura 9.- Levantamiento de genes de interés presentes en la cepa S288c..... | 54 |
| Figura 10.- Levantamiento del gen noxE que codifica para unaNADH oxidasa citosólica..... | 56 |
| Figura 11.- Esquema del gen VDBG_02539 para un putativo transportador de polioles..... | 58 |
| Figura 12.- Metodología empleada para la construcción del cDNA del gen VDBG..... | 59 |
| Figura 13.- Resumen de resultados obtenidos en la síntesis de cDNA por PCR recursivo y PCR de extensión | 60 |
| Figura 14.- Módulos de expresión construidos en esta tesis..... | 63 |
| Figura 15.- Resultados de PCR de elongación del módulo m-MDH | 66 |
| Figura 16.- PCR para identificar clones de E.coli con módulo m-ADH..... | 68 |
| Figura 17.- Esquema representativo de las etapas para la transformación de la cepa de <i>S.cerevisiae</i> resistente al antibiótico higromicina B | 72 |
| Figura 18.- Resultados de PCR para clones transformados con módulo de resistencia a higromicina B..... | 73 |
| Figura 19.- Fotografía comparativa entre las cepas sRSc (<i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red™ silvestre) y la cepa resistente a higromicina B, ShphRSs..... | 74 |
| Figura 20.- Esquema del orden de inserción de módulos para la transformación de <i>S.cerevisiae</i> productora de etanol a partir de manitol | 76 |
| Figura 21.- Evaluación por PCR de los clones obtenidos para la transformación Manitol deshidrogenasa..... | 78 |
| Figura 22.- Resultados de PCR para comprobar la presencia de ambos módulos en las cepas sMDHc1 y 2..... | 79 |
| Figura 23.- Gráfico de producción de etanol en anaerobiosis y aerobiosis de cepas sMDHc 1 y sMDHc2..... | 81 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| 1kbp | Marcador de peso molecular 1kpb |
| 100bp | Marcador de peso molecular 100 pb |
| 50bp | Marcador de peso molecular 50pb |
| Aa | Aminoácidos |
| ADH1 | Alcohol deshidrogenasa 1 |
| Amp | Ampicilina |
| ATP | Adenosin tri-fosfato |
| C | Celcius |
| cDNA | DNA complementario |
| CIBYB | Centro de ingeniería bioquímica y biotecnología |
| DEH | 4-doxi-L-eritro-5-hexoseulosa |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTPs | Deoxiribonucleótidos trifosfato |
| DO | Densidad óptica |
| E10 | 10% etanol y 90 % gasolina |
| FDA | Sección de Administración de Alimentos y Drogas del Departamento de Salud y servicios humanos de Estados Unidos |
| g | gramo |
| GC | Cromatógrafo de gases |
| kΩ | Kiloohm |
| Kan | Kanamicina |
| KDG | 2-ceto-3-déoxi-D-glucónico |
| kg | kilogramo |
| l | litro |

| | |
|---------------|---|
| m | metro |
| M | molar |
| MCS | Sitio de múltiple clonamiento |
| MDH | Manitol 2 deshidrogenasa |
| MFS | Major facilitator superfamily |
| min | Minutos |
| ml | mililitros |
| mM | milimolar |
| mRNA | RNA mensajero |
| ms | Milisegundos |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| ng | Nanogramos |
| nm | Nanometros |
| NMR | Resonancia magnética nuclear |
| NRRL | Agricultural Research Service Culture Collection |
| OCDE | Organización para la cooperación y el desarrollo económicos |
| OE-PCR | PCR de extensión |
| ORF | Marco de lectura abierto |
| pb | Pares de bases |
| pBS | pBluescript SK II (+) |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PDC1 | Piruvato decarboxilasa 1 |
| pH | Potencial hidrógeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundos |

| | |
|--------------|--|
| subsp | Subespecie |
| sRSc | Cepa de <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red™ de Red Star® |
| Tris | Tris-(hidroximetil)-aminoetano |
| U | Unidad enzimática |
| μF | Microfaradios |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| μg | Microgramos |
| UV | Radiación ultravioleta |
| V | Voltio |
| x g | Fuerza centrífuga |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido |

RESUMEN

Las crecientes demandas de recursos naturales para la producción de biocombustibles de primera generación, el empleo de compuestos lignificados en los de segunda generación y la depleción de los combustibles fósiles exige el estudio de nuevas fuentes de biomasa como las macroalgas. La potencialidad de las macroalgas como fuente de biomasa para la producción de bioetanol requiere la implementación de técnicas de ingeniería genética en microorganismos estandarizados para la producción industrial de bioetanol tal como la cepa Ethanol Red™ de *Saccharomyces cerevisiae*. Aquí se presenta la evaluación metabólica del manitol como fuente de biomasa para la fermentación alcohólica por parte de esta levadura. Se amplificó y clonó el gen *hph* de *E. coli* (de resistencia a higromicina B), los genes ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1), PDC1 (piruvato decarboxilasa) y YNR073c (Putativa manitol deshidrogenasa) de la cepa S288c y el gen *noxE* (NADH oxidasa citosólica) de *Lactococcus lactis*. Además se sintetizó el cDNA de un gen que codifica para un putativo transportador de polioles de *Verticillium albo-atrum*. Se armaron módulos de expresión y se implementó la técnica de DNA *assembler* para la obtención de una cepa portadora de los genes *hph* y YNR073c integrados cromosómicamente en la región YPR τ 3 que corresponde a un transposón de tipo Ty4. Se obtuvo una cepa de levadura industrial Ethanol Red™ denominada sMDHc 2 capaz de producir ~4,34 g/l de bioetanol en medios al 2% de manitol, concluyéndose la eficiencia de esta técnica en la transformación de cepas de *S. cerevisiae* industriales. Estos resultados indican la necesidad de evaluar la expresión del gen *noxE* y de un transportador específico de manitol que permita optimizar la producción en condiciones anaeróbicas.

ABSTRACT

The increasing demand placed on natural resources for first generation biofuels production, the use of woody compounds in second generation fuels synthesis, depletion of fossil fuels and global warming require the study of new feedstock sources such as seaweeds. For macroalgae to fulfill its potential as biomass for bioethanol production the implementation of genetic engineering techniques in industrial standardized microorganisms such as Ethanol Red™ *Saccharomyces cerevisiae* strain is necessary. Here, a metabolic assessment of mannitol is presented as a strategy for fermentation of this sugar by this yeast. The following genes were amplified and cloned: *hph* gene from *E. coli* (hygromycin B resistance); ADH1 (alcohol dehydrogenase 1), PDC1 (pyruvate decarboxylase) and YNR073c (putative mannitol dehydrogenase) from *S. cerevisiae* S288C; and the *noxE* gene (cytosolic NADH oxidase) from *L. lactis*. Furthermore, the cDNA from a *Verticillium albo - atrum* gene coding for a putative poliol transporter was synthesized. Expression cassettes were assembled and the “DNA assembler” technique was used in order to obtain a yeast strain carrying the *hph* and YNR073c genes chromosomally integrated into the YPR τ 3 region corresponding to a ty4 transposon. An industrial yeast strain named sMDHc 2 was constructed and it was capable of producing ~ 4,34 g/l of ethanol in a 2 % mannitol media, concluding that this technique is effective in industrial yeast strains. These results indicate the need to assess the expression of the *noxE* gene and mannitol specific transporter in order to optimize ethanol production under anaerobic conditions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Demanda de combustibles – desafío global

Desde hace algunas décadas se ha observado un importante crecimiento de la población mundial. Estos drásticos cambios demográficos han impactado gravemente la biodiversidad, lo que se ve representado en el “Índice de vida en el planeta” (Del inglés, Living Planet Index, LPI) que muestra una baja del 28% de la biodiversidad entre los años 1970 y 2008 (WWF, 2012). No obstante, mientras los países desarrollados pertenecientes a la OCDE muestran una caída en el consumo de combustibles, las naciones en vías de desarrollo que no pertenecen a esta asociación enfrentan grandes demandas energéticas a fin de sustentar su crecimiento económico (U.S. Energ. Inform. Admin, 2013).

En 2012, el consumo mundial primario de energía fue de 12476,6 millones de toneladas de petróleo que equivalen a 522 exajoules de poder energético. De esta enorme cantidad utilizada, sólo el 1,9 % corresponde al aporte de energías renovables (Figura 1) (BP, 2013).

Por otro lado, el incremento de la población ha desencadenado un alza del 28% de la demanda energética en el sector transporte, responsable del 23 % de los gases invernadero presentes en la atmósfera. Esto se debe a que los automóviles obtienen su energía directamente desde la combustión del petróleo (Kahn y col., 2012).

El calentamiento global, el agotamiento del crudo y el aumento del precio de las gasolinas, han encendido las alarmas a la búsqueda de nuevas fuentes de energía, sustentables, renovables, eficientes, costo-efectivas, en armonía con el medio ambiente (Nigam & Singh 2010) , permitiendo un alto consumo a fin de mantener y/o acrecentar los estándares de vida de la población (Chappells & Shove 2005).

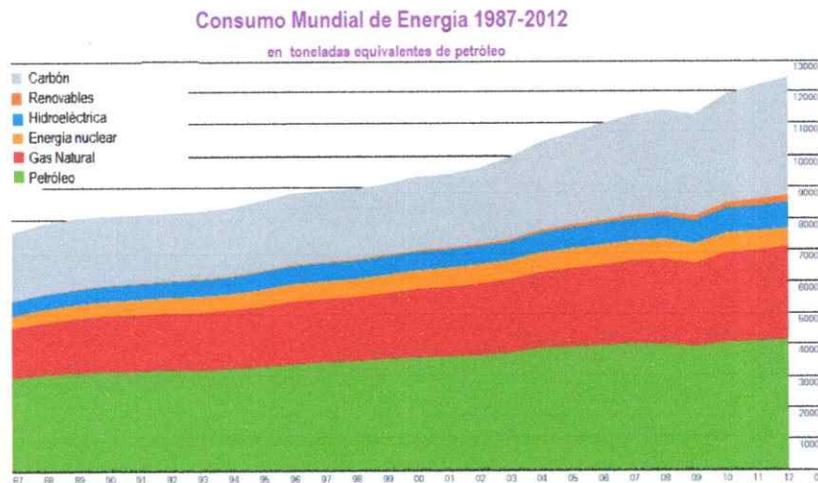


Figura 1.- Consumo mundial de energía entre 1987 y 2012. Gráfico tomado y modificado de “Statistical Review of World Energy” (BP, 2013). En él se observa el consumo primario de los distintos tipos de energía. Nótese el pequeño aporte de las energías renovables en naranja oscuro.

Actualmente, importantes economías emergentes, tales como Sudáfrica, México y Chile, han comenzado a destinar fondos para desarrollar estos tópicos (Frankfurt School-UNEP Centre/BNEF, 2013). Es evidente que el camino más viable para alcanzar estos objetivos es desviar el uso desde los combustibles fósiles hacia los combustibles renovables, tales como el uso del deuterio a partir de agua (contenido energético para 1 l igual a 300 l de gasolina) (Kulov, 1996) y las energías geotérmica y eólica (Tester y col., 2006). Desafortunadamente, para hacer uso de estas nuevas

energías se requieren cambios significativos en el diseño de los motores y en el sistema eléctrico de los vehículos. Por esta razón, el propósito más sostenible, es desarrollar combustibles provenientes de fuentes biológicas renovables que puedan ser combustionados con la tecnología existente.

1.2 Biocombustibles.

Existe una gran diversidad de biocombustibles y casi todos llevan el prefijo “bio” (bioetanol, biodiesel, biometanol, biogás, etc), que hace alusión a su origen biológico (Ndimba y col., 2013). Sin embargo, la presente tesis se centrará en la producción de bioetanol: combustible obtenido a partir de la fermentación de azúcares provenientes de cualquier fuente de biomasa aplicable.

En la actualidad, el bioetanol se utiliza en mezclas con gasolina (ej. gasolina E10, 10% etanol y 90% gasolina) y no puro, para permitir su utilización (Connor & Atsumi 2010). Por otra parte, existe gran diversidad de biocombustibles en función de la fuente de biomasa utilizada para su producción. Luego de dos décadas, los biocombustibles han sido categorizados en tres generaciones consecutivas. La primera generación corresponde a aquellos derivados de cosechas alimentarias consistentes en productos brutos de la agricultura (caña de azúcar, maíz, semillas, cereales, soya y leguminosas). La segunda generación se produce a partir de material lignocelulósico proveniente de desechos agrícolas, forestales y/o pastos perennes. Finalmente, los combustibles de tercera generación se caracterizan por utilizar fuentes de biomasa distintas a las de las dos generaciones anteriores, tales como las algas (Stephanopoulos, 2007).

La producción de biocombustibles más importante en el mundo es la de primera generación. Los mayores exponentes son Estados Unidos y Brasil, siendo este último el responsable de proveer del 25% de la demanda de combustibles destinados al transporte en ese país (Amorin, y col., 2011). No obstante, la producción de éstos compite por la superficie de suelo arable lo que conlleva a un alza en el precio de los alimentos (Goh & Lee, 2010). Por otro lado, los biocombustibles de segunda generación (cuando son producidos a partir de residuos agrícolas) no significan competencia directa con el mercado de los alimentos y permiten darle utilidad a los desechos orgánicos (anualmente se generan 2 billones de toneladas de residuos de la cosecha del arroz) (Wi y col., 2013), a no ser que se generen a partir de pastos donde sí consumen recursos (suelo, agua y nutrientes) (Jordan y col, 2009). Además, al presentar tejidos vegetales de difícil remoción, su producción exige procesos industriales agresivos y contaminantes de alto costo que favorezcan una eficiente hidrólisis de la lignina y hemicelulosas, razón por la que no se han documentado proyectos con proyección comercial de éxito (Naik y col., 2010).

Para producir cualquiera de los dos primeros tipos de combustibles podría ser necesario inducir conversión del suelo (Fargione y col., 2008), proceso de larga adaptación, costoso y que emana grandes cantidades de CO₂ a la atmósfera (Searchinger y col., 2006), tal como ocurre en el sur de Asia, donde se suscitan entre 2,8 y 19,7 kg de CO₂ por kg de aceite (Reijnders & Huijbregts 2008). Además, la agricultura en terrenos no acostumbrados a la siembra, y el uso de monocultivos, también terminan por dañar la biodiversidad de los ecosistemas (Danielsen y col., 2009).

Aunque sirviendo demandas socio-ecológicas iniciales, estas fuentes se han empezado a considerar menos fértiles y lucrativas de lo esperado. Por lo tanto, se ha comenzado a explorar una nueva fuente de biorecursos y es clasificada como tercera generación (Lee & Lavoie 2013.)

1.3 Tercera Generación: Biocombustibles algales.

En 1985 se discute por primera vez la potencialidad que poseen las cianobacterias como fuente de energía renovable (Lem & Glick 1985). Sin embargo, éste y otros estudios fueron dejados en el olvido hasta el advenimiento de los biocombustibles de primera y segunda generación, y sus inconvenientes.

Los ecosistemas algales están dentro de los más productivos de la Tierra (Stevenson y col., 1996) ya que poseen una rápida tasa de recambio (McCormick & Cairns 1994) y son sumamente diversos (300.000 especies) (Scott y col., 2010). Por otro lado, al no requerir de tierras para su cultivo, evitan los problemas económicos inherentes a la gestión de los predios en la industria alimentaria y no tienen efectos de la conversión del suelo (Hu y col., 2008).

Las algas se pueden clasificar en microalgas y macroalgas. Las primeras son generalmente organismos unicelulares de pequeño tamaño, mientras que las segundas desarrollan cuerpos macroscópicos pluricelulares similares a las plantas terrestres. Ambos tipos algales producen grandes cantidades de energía química reservada en moléculas de hidratos de carbono hidrolizables y lípidos (John y col., 2011).

Las microalgas son utilizadas en la producción de biodiesel vía transesterificación (Johnson & Wen 2009) ya que poseen gran cantidad de grasas (ej. *Nannochloropsis* sp. 60% del total de su biomasa corresponde a ácidos grasos) (Rodolfi y col., 2009). Sin embargo, deben ser cultivadas bajo estrictas medidas de esterilidad (Barbosa y col., 2003) y sometidas a altísimos niveles de energía durante la transesterificación, lo que hace de la producción de combustibles a partir de microalgas, un proceso sumamente costoso (Dimitrov, 2007).

1.4 Macroalgas

Por su parte, las macroalgas significan un enorme potencial para producir bioetanol ya que poseen entre un 40-70% de carbohidratos solubles (Dawes y col., 1974). Esta composición difiere dependiendo de la especie, las condiciones ambientales y la salinidad del agua (Mian & Percival 1973; Rioux y col., 2007). Además, los residuos de la producción de etanol pueden ser utilizados para la producción de biogás (metano), incrementando su rentabilidad (Park y col., 2012).

Son principalmente cultivadas como alimento (145 especies) y comercializadas como fuente de ficocoloides (101 especies) (Zemke-White & Ohno 1999), mercado que ha mostrado un importante incremento los últimos 10 años (FAO, 2012). Son clasificadas según su composición de pigmentos en algas verdes (*Chlorophyta*), pardas (*Phaeophyta*), rojas (*Rhodophyta*) (Roesijadi y col., 2010; Reith y col., 2009) y no contienen cantidades significativas de glucosa libre (Ito & Hori 1989). Además, presentan bajos niveles de polímeros en red tipo *crosslinking*, como lignina y hemicelulosa (Martone y col., 2009), lo que facilita la liberación de azúcares utilizables

para la fermentación (Yanagisawa y col., 2011). A continuación, la Tabla 1 presenta un resumen que muestra la composición diferencial de carbohidratos en las tres familias de macroalgas.

Las macroalgas pueden ser cultivadas tanto en ambientes acuáticos naturales como en sistemas técnicos de cultivo: estanques abiertos y fotobiorreactores cerrados (Borowitzka, 1999). El primero se caracteriza por ser menos costoso y de fácil operación, sin embargo, han de ser construidos en terrenos planos que ocupan largas extensiones de tierra (Hase y col., 2000). Por su parte, los fotobiorreactores han sido optimizados matemáticamente en cuanto a su desarrollo y funcionalidad (Frohlich y col., 1983; Evers, 1991; Dermoun y col., 1992; Molina Grima y col., 1993a, 1996b).

Tabla 1.- Composición diferencial de carbohidratos en macroalgas.

| Macroalga | Monosacáridos | Polisacáridos | Referencia |
|-------------------|---------------|---------------|-----------------------------|
| Alga verde | Manosa | Ulvano | • Turvey & Christison 1967. |
| | Ramnosa | Almidón | • Briand & Morand 1997. |
| | Xilosa | Celulosa | |
| | Uronato | | |
| | Glucuronato | | |
| | Glucosa | | |
| Alga roja | Agarosa | Carragenina | • Msuya & Neori 2002 |
| | Galactosa | Agar | • Martone. y col., 2009. |
| | Glucosa | Celulosa | |
| | | Lignina | |

| | | | |
|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------------------|
| Alga parda | Manitol | Alginato | • Chynoweth & Srivastava 1980 |
| | Glucosa | Fucoidano | • Reith y col., 2009 |
| | Galactosa | Laminarina | • Jang y col., 2012 |
| | Fucosa | | |
| | Xilosa | | |
| | Uronato | | |
| | Manuronato | | |
| | Guluronato | | |
| | Glucuronato | | |

1.4.1. Algas pardas - *Macrocystis pyrifera*.

Las macroalgas pardas y rojas son las que más se dan en las costas chilenas y su distribución varía según la región del país, con predominio de algas pardas en la zona norte, de algas rojas en el centro y de ambas en el sur (Norambuena, 1996). Una de las macroalgas *Phaeophyta* que más abunda en las costas chilenas es *Macrocystis pyrifera* ("Huiro") ya que genera estructuras tipo marquesina (Rosenthal y col., 1974): colchones flotantes ricos en biomasa que alcanzan rendimientos en peso húmedo de alrededor de 6 kg/m² (Jackson, 1977). Además, posee un alto contenido de extracto no nitrogenado (75,3%) que corresponde a carbohidratos solubles y carragenanos (Ortiz Viedma, 2011). El principal polisacárido en *M. pyrifera* es el alginato (15-25%), seguido por poliol libre manitol (9-30%) y el polímero glicano (5%) (Cribb, 1954; Doezema & Phillips 1970; McKee y col., 1992). La variación en la concentración porcentual de estos azúcares, depende de los cambios estacionales, aumentando la cantidad relativa de manitol durante la primavera en concordancia a una mayor tasa fotosintética (Rosell &

Srivastava 1984). Esta razón alginato/manitol se verá afectada además, por las características fisicoquímicas del agua, temperatura, disponibilidad de nutrientes, edad, localización geográfica y condiciones de estrés (Gutierrez y col., 2006; Adams y col., 2011; Westermeier y col., 2012).

Estudiando más en detalle la composición de los azúcares de *M. pyrifera*, vemos que el alginato -ácido alginico- es un polisacárido aniónico lineal constituido por la unión de ácido β -D- manurónico (M) y ácido α -D-gulurónico (G), pudiendo encontrarse como polisacárido de unidades de MM, GG, MG, mezclas de todos ellos o con ramificaciones (Morris y col., 1980; Grasdalen, 1983) (Figura 2).

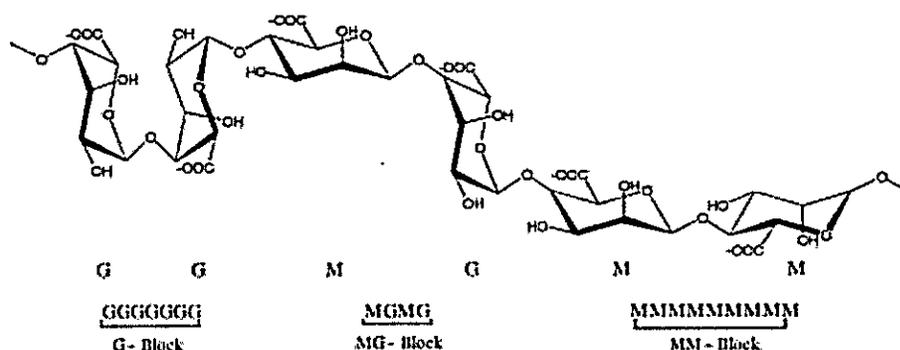


Figura 2.- Estructura orgánica del polímero de alginato. Se observan las tres posibles conformaciones secuenciales del polisacárido: poli G, poli MG y poli M (Extraída de Torres y col., 2007).

Por su parte, el D -Manitol es un hexitol ubicuo en la naturaleza, encontrándose además en plantas (Stoop y col., 1996) y hongos (Solomon y col., 2007). Se ha documentado su presencia en el humano (Pitkanen & Pitkanen 1964) y es empleado como aditivo en la industria alimenticia (Sicard & Leroy 1983). A pesar de que su rol

biológico no está completamente dilucidado, existe evidencia científica suficiente que declara su importancia en la fisiología de plantas (Trip y col., 1964), animales (Morawski y col., 2003) y seres humanos (Vinson y col., 1989). En solución acuosa, adopta una conformación *zigzag* plana (Franks y col., 1974), y generalmente secuestra iones metálicos formando quelatos muy estables (Antikainen, 1959).

Dentro de los demás azúcares de *Macrocystis* encontramos al glicano (en algas pardas: laminarina), compuesto de unidades lineales de (1,3) y (1,6)- β -D-glucanos en proporción 3:1 (Read y col., 1996), y en muy pequeñas concentraciones los fucoidanos (Eardley y col., 1990).

Existe un creciente interés por la aplicación de estos carbohidratos como anticancerígenos (Arica y col., 2002), en la ingeniería de tejidos (King y col., 1987) y cómo destinadores de drogas (Lee & Mooney 2012). No obstante, es el empleo de éstos como fuentes de biomasa fermentable para la producción de bioetanol los que despiertan un mayor entusiasmo en la comunidad científica. A pesar de que existen organismos naturales capaces de catabolizar estos azúcares -como las marinas flavobacterias- (Thomas y col., 2012), los microorganismos estandarizados industrialmente para producir bioetanol no tienen la riqueza genética ni metabólica para llevar a cabo las reacciones enzimáticas necesarias que permitan desviar estos carbohidratos a la vía glicolítica.

Recién en enero de 2012, un estudio publicado en la revista Science documenta la obtención de una cepa de *Escherichia coli* capaz de fermentar hasta etanol el alginato del alga parda *Saccharina japonica* empleando técnicas de ingeniería genética

(Wargacki y col., 2012.). Adicionalmente, un estudio realizado por el departamento de energía de los Estados Unidos indica una productividad teórica de bioetanol cercana a 59 toneladas por hectárea al año, con un rendimiento ideal de 0,254 (peso de bioetanol/peso seco de macroalga) (Roesijad y col., 2010). Basado en estos números se estima una productividad óptima de 19000 l por hectárea al año, valor aproximadamente dos veces mayor al alcanzado por la caña de azúcar en Brasil (Somerville y col., 2010). A partir de este y otros estudios se abre camino a la búsqueda de nuevas plataformas ingenieriles que permitan modificar genéticamente microorganismos industriales, como *Saccharomyces cerevisiae*, para así alcanzar o acercarse a dichos esperanzadores rendimientos.

1.5 Producción de bioetanol a partir de azúcares de *M. pyrifera*.

Se han desarrollado técnicas de ingeniería genética que dirigen la incorporación de genes involucrados en rutas degradativas de diferentes carbohidratos en microorganismos que no poseen la habilidad natural de catabolizarlos (*E. coli* y *S. cerevisiae*). Dentro de estos estudios, destaca la expresión de los genes XYL1 (xilosa reductasa) y XYL2 (xilitol deshidrogenasa) de *Pichia stipitis* en *S. cerevisiae* para la producción de bioetanol a partir de xilosa (Walfridsson y col., 1997), avances en ingeniería metabólica para la producción de bioetanol desde residuos lignocelulósicos en *E. coli* (Ingram y col., 1998) y un sinnúmero de estudios matemáticos que buscan optimizar los rendimientos de la producción en levadura (Brown y col., 1997) y *E. coli* (Kalscheuer y col., 2006). No obstante, es muy escasa la bibliografía enfocada a la

fermentación de azúcares algales, destacando un trabajo de ingeniería genética en *E. coli* para degradar el alginato y producir un metabolito común que alimenta la vía de Entner-Doudoroff (Glucosa→Piruvato) (Wargacki y col., 2012), y un estudio que refiere la obtención de una cepa de *Sphingomonas sp.* modificada genéticamente con una homovía de producción de etanol a partir de alginato (Takeda y col., 2011). Sin embargo, estos estudios no presentaron adaptaciones ni optimizaciones robustas a nivel industrial (Alper & Stephanopoulos 2009).

Respecto a la levadura *S. cerevisiae*, existen algunas cepas productoras de etanol industrial caracterizadas en cuanto a sus propiedades fermentativas y genéticas, tales como la cepa Ethanol Red™ (Devantier y col., 2005) y la cepa CAT1 (Babrzadeh y col., 2012), susceptibles de ser modificadas genéticamente. Además, desde hace cientos de años se ha utilizado *S. cerevisiae* como agente biológico en procesos de la industria del pan y la fermentación de bebidas alcohólicas. Actualmente, la FDA ha reconocido como seguro el empleo de este microorganismo (GRAS, Generally Recognized As Safe), (Huang y col., 2008) y es el primer eucarionte en tener su genoma completamente secuenciado (Goffeau y col., 1996). Esto ha permitido un acelerado conocimiento del detalle de sus genes (Giaver y col., 2002), su regulación génica a nivel transcripcional (Wodicka. y col., 1997; Lee y col., 2002), sus interacciones DNA-proteína (Ho y col., 2002; Krogan y col., 2006), estudios matemáticos a escala genómica (Förster y col., 2003) y avances en ingeniería genética y metabólica (Ostergaard y col., 2000) que hacen de éste un microorganismo idóneo para estudiar la fermentación de azúcares algales.



Al día no existen estudios que evalúen la capacidad fermentadora de *S. cerevisiae* para degradar los compuestos algínicos. Este microorganismo no cuenta con las enzimas alginato liasas (Alys), que catalizan la despolimerización del alginato en oligómeros (Wong y col., 2000.), tampoco posee la enzima oligoalginato liasa (Oal), que degrada los oligómeros hasta ácido urónico 4-doxi-L-eritro-5-hexoseulosa (DEH) (Ochiai y col., 2010), y tampoco porta el gen que codifica para la enzima DEH-reductasa que reduce el DEH en ácido 2-ceto-3-deoxi-D-glucónico (KDG), que finalmente se fermenta a etanol (Preiss & Ashwell 1962; Takase y col., 2010); reacciones muy conservadas en los organismos capaces de degradar el alginato (Gacesa, 1992; Ochiai y col., 2006).

Respecto a la capacidad catabólica y fermentadora de *S. cerevisiae* del manitol existe bastante controversia y contradicción en la literatura. Los primeros estudios se presentan en el trabajo "Mannitol uptake by *Saccharomyces cerevisiae*" donde se evaluó su capacidad para ingresar el manitol. Los resultados de esta investigación demostraron que la entrada de manitol no es constante, y que cuando ocurre depende de energía tipo ATP. Además, se observó que el manitol no ingresa al citosol en condiciones anaerobias estrictas. Por lo tanto, *S. cerevisiae* no cuenta con transportadores específicos de manitol, y que éste al ingresar, estaría empleando transportadores de hexosas promiscuos (Maxwell & Spoerl 1971). En cuanto a la capacidad metabólica, el año 1987 se obtuvo resultados bastante disímiles al evaluar la capacidad de crecer y metabolizar el manitol de 40 cepas diferentes de *S. cerevisiae*. Algunas de estas cepas pudieron crecer a bajas concentraciones de manitol (1-2%), y otras, que inicialmente no crecían en

manitol, fueron capaces de adaptarse levemente a su consumo (a los 17 - 21 días). De las cepas capaces de crecer y utilizar el manitol como única fuente de carbono y energía, ninguna de ellas pudo utilizar el polialcohol bajo condiciones anaerobias estrictas, además, ninguna de las cepas haploides ensayadas (ej. S288c) fue capaz de utilizar el manitol y/o de adaptarse a su consumo, mientras que las cepas que sí lo hacían eran aneuploides (Quain & Boulton 1987). A partir de este trabajo inicial, no fue sino hasta 2013 que otro grupo de investigadores documentó la existencia de una cepa de *S. paradoxus*, denominada NBRC 0259, que no tan sólo era capaz de crecer en manitol sino que además producía etanol. No obstante, los argumentos que se deducen de su obtención no están del todo esclarecidos y no se han realizado ensayos que evalúen su aplicabilidad industrial (Ota y col., 2013).

A raíz de estos disímiles resultados, y evaluando el genoma de la cepa estándar *S. cerevisiae* S288c, se observan dos marcos abiertos de lectura idénticos que codificarían para una putativa enzima del tipo manitol 2 deshidrogenasa (YNR073c/YEL070W) que en algunas de esas cepas se pudo haber activado. Sin embargo, estos genes no forman parte del transcriptoma de esta levadura y estarían comandados por un promotor permanentemente inhibido que se activa sólo en presencia de una proteína activadora ausente (Perfect y col., 1996).

A pesar de que existe evidencia de que algunas cepas de *Saccharomyces* pueden tomar del medio y utilizar el manitol como única fuente de carbono y energía, en todos los casos su catabolismo no es compatible en condiciones anaeróbicas estrictas. Por un lado, los potenciales transportadores endógenos promiscuos que permiten captar el

manitol del medio requieren energía del tipo ATP, escasa durante la glicólisis. Por otro, la fermentación del manitol genera un exceso de poder reductor (NADH) que no puede ser compensado en ausencia de oxígeno (Quain & Boulton 1987).

El trabajo realizado en este seminario de título buscó crear, mediante técnicas de ingeniería genética, nuevas cepas de *S. cerevisiae* industriales productoras de bioetanol empleando el manitol como única fuente de carbono y energía.

1.6 Diseño de una estrategia de ingeniería genética.

Para diseñar una estrategia de transformación genética que permita producir bioetanol en la levadura *S. cerevisiae* a partir de manitol es de crucial importancia buscar posibles vías metabólicas candidatas en la literatura.

1.6.1 Metabolismo del Manitol.

El manitol (Figura 3), como intermediario metabólico, es sumamente conservado y ubicuo en la naturaleza (Lewis & Smith 1967; Hörer y col., 2001). No obstante, se revisarán los procesos enzimáticos que ocurren en el reino *fungi* dada las propiedades filogenéticas de *S. cerevisiae*.

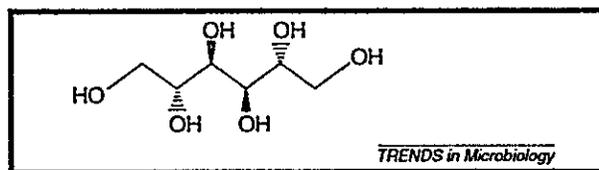


Figura 3.- Estructura orgánica del Manitol. Extraída y modificada de Solomon y col., 2007.

Inicialmente se propuso la existencia de un ciclo metabólico de manitol en *Alternaria alternata* (Hult & Gatenbeck 1978) (Figura 4), en el que participaban cuatro enzimas: Manitol-1-fosfato deshidrogenasa (MPD), NADP- Manitol -2-deshidrogenasa (MDH), Manitol-1-fosfato fosfatasa (MPP) y hexoquinasa (HX).

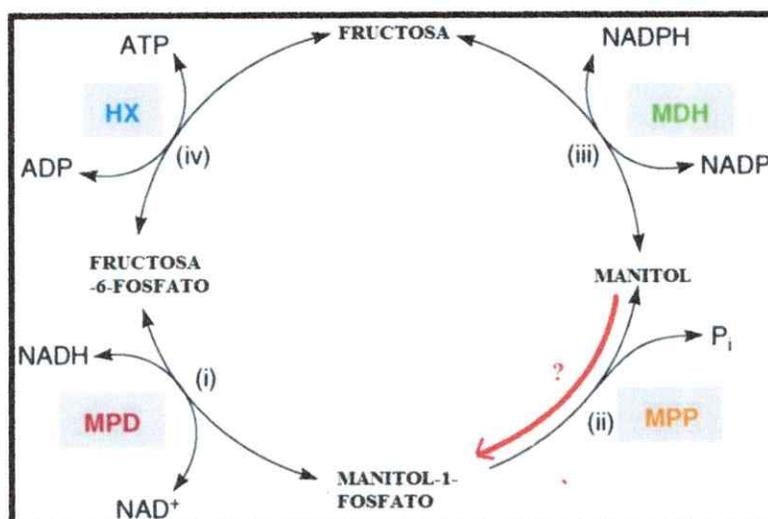


Figura 4.- Ciclo del Manitol. i) Surge desde la glicólisis en el intermediario fructosa-6-fosfato, que es convertido a manitol-1-fosfato por la enzima MPD. ii) La biosíntesis de manitol se cree que ocurre a través de la desfosforilación del manitol-1-fosfato por la enzima MPP. iii) El manitol es oxidado y convertido en fructosa por la MDH, que es subsecuentemente fosforilada por la HX a fructosa-6-fosfato, completando el ciclo. La flecha roja indica la reacción catabolizada por la posible manitol quinasa. (Extraída y modificada de Solomon y col., 2007)

De este modo, el ciclo del manitol se enraizaría fuera de la glicólisis con punto pivotante en fructosa-6-fosfato. La evidencia inicial que avalaba la existencia de este ciclo fue la aparente irreversibilidad de la reacción de desfosforilación del Manitol-1-fosfato por parte de la MPP para producir manitol (Jennings, 1985). Por otro lado, no se logró evidenciar actividad manitol quinasa, favoreciéndose aún más la existencia de este

ciclo. (Strandberg, 1969; Schmatz y col., 1989; Karsten y col., 1997). Sin embargo, nuevos estudios cuestionaron el metabolismo del manitol operante a través de un ciclo al estudiar los hongos *A. alternata* y *Stagonospora nodorun* (Solomon y col., 2006; Véléz y col., 2007) y al demostrar que existirían rutas catabólicas alternativas diferentes a la vía de la fructosa (Jennings, 1985). Esto se sustenta en estudios en los que se discute la existencia de una posible manitol quinasa capaz de fosforilar el manitol (Ueng y col., 1976), así como de una manitol acetil fosfato fosfotransferasa en *Aspergillus* (Lee, 1967). Estos resultados disímiles continúan en discusión en la actualidad, aceptándose la participación de ambas vías de forma independiente en el catabolismo del manitol (vía fructosa y vía fructosa-6-fosfato) (Solomon y col., 2007)

1.6.2 Búsqueda de riqueza genética.

Luego de evaluar la capacidad metabólica del manitol en *S. cerevisiae*, y una vez comprendido su metabolismo en hongos, resulta necesaria la búsqueda de riqueza genética en diferentes organismos a fin de diseñar una estrategia ingenieril de transformación en la levadura. A raíz de lo anterior, se destacan los siguientes puntos:

1.- Asumiendo que aquellas levaduras capaces de adaptarse al consumo de manitol lo ingresan al citoplasma celular empleando transportadores de azúcar promiscuos (Quain & Boulton 1987), resulta crucial la incorporación de un gen que codifique para un transportador de manitol en la levadura.

2.- Por otro lado -y evaluando lo que se sabe en *Sacharomyces* y el reino fungi- es fundamental la expresión de una enzima que permita desviar el manitol a la glicólisis por alguna de las dos vías posibles: fructosa o fructosa-6-fosfato. Debido a la gran

discusión que existe sobre la existencia de una manitol quinasa, así como la participación de dos enzimas consecutivas (manitol quinasa y manitol fosfato deshidrogenasa) para la producción de fructosa-6-fosfato, se optó por desdoblar el manitol a fructosa expresando un gen que codifique para una manitol 2 deshidrogenasa, gen que se encuentra en dos marcos abiertos de lectura en la cepa de *S. cerevisiae* S288c.

Dentro de los estudios que indican riqueza genética para un transportador de manitol destaca uno del año 2011 en el que se caracterizó un operón básico para el catabolismo del manitol en el actinomiceto *Corynebacterium glutamicum* cepa R (Peng y col., 2011). Dentro de los genes de este operón, se encuentra uno que codifica para un transportador específico de manitol (mtIT) del tipo MFS ('Major Facilitator Superfamily') y cuya predicción estructural indica 12 segmentos de transmembrana de tipo permeasa (Reddy y col., 2012). Estudiando más en detalle la posibilidad de utilizar el gen de esta permeasa y no obstante sus beneficios (no consume ATP), la expresión de este transportador de manitol (mtIT) en levadura, podría – *a priori* - resultar muy dificultosa por tratarse de un gen procarionte. Por otra parte, se han caracterizado algunos transportadores específicos y otros un tanto más promiscuos. Entre ellos destacan algunos de plantas, como AgMt1 (Noiraud y col., 2001) y AgMt2 (Juchaux-Cachau y col., 2007) de apio que co-transportan manitol acoplado al gradiente de protones. Estos transportadores han sido estudiados usando como modelo heterólogo *S. cerevisiae*, y aunque favorecen el ingreso del manitol al citoplasma celular, éste se inhibe cuando se adiciona glucosa u otros azúcares al medio y acidifican el medio

intracelular lo que modifica las propiedades electrofisiológicas de la membrana. Algo similar ocurre con algunos transportadores de polioles presentes en *Arabidopsis thaliana* como el transportador de polioles/monosacáridos 5 (Keplek y col., 2004).

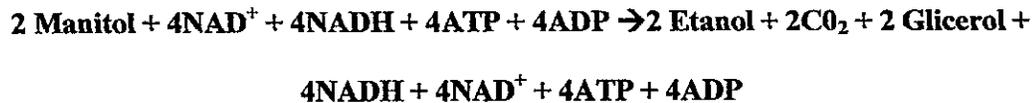
Por otro lado, al buscar potenciales genes evolutivamente cercanos a *S. cerevisiae* en los ascomicetos, el único gen candidato es el gen VDBG_02539 de *Verticillium albo-atrum* que codifica para una proteína putativa (Polyol transporter 5) y que pertenece a la base de datos del NCBI (Gene ID: 9535451) (Acland y col., 2013). Este gen de 2385 pb está constituido por 5 exones que juntos codifican para una proteína de 634 aminoácidos y cuya estructura tridimensional clasifica como transportador de polioles secundario tipo MFS (Marchler-Bauer y col., 2013).

Por lo tanto, se decidió trabajar con el gen que codifica para un putativo transportador de polioles de *V. albo-atrum*, y por otro, con el gen putativo de *S. cerevisiae* YNR073c que codifica para una putativa manitol deshidrogenasa presente en la cepa S288c.

1.6.3 Desbalance del equilibrio óxido-reducción.

No obstante, la expresión de estos dos genes no garantiza que la levadura produzca grandes cantidades de etanol empleando el manitol en anaerobiosis. A pesar de que la manitol deshidrogenasa catalizaría directamente la transformación del manitol en fructosa, esta enzima al emplear el cofactor NAD^+ producirá un equivalente de NADH por molécula de manitol que ingresa a la vía glicolítica. Esta situación inicial gatillaría un desbalance óxido-reducción global en la levadura que en condiciones anaeróbicas

activaría, además de la vía de formación de etanol (que restituye el NAD^+), la ruta biosintética del glicerol obteniéndose el siguiente balance metabólico (extraído de Quain & Boulton 1987):



De este modo, un sólo equivalente redox NADH de exceso producido en condiciones anaeróbicas generará un balance nulo de moléculas de ATP que no le permiten crecer a *S. cerevisiae* en anaerobiosis cuando la única fuente de carbono y energía es el manitol. Este fenómeno predicho en el año 1987, fue corroborado por Ota y colaboradores (2013) al observar que cepas de levadura capaces de crecer en manitol y oxígeno dejaban de hacerlo cuando este último era extraído. Si bien, condiciones fermentativas con oxigenación moderada permiten activar momentáneamente la cadena de fosforilación oxidativa para generar ATP a partir de este exceso de NADH, se observaría un marcado desmedro de la tasa de rendimiento de producción de etanol, alejándose de los rendimientos esperados (Maxwell. & Spoerl 1971; Ota y col., 2013).

Muchos trabajos han sido desarrollados en levadura para solucionar problemas del balance óxido-reducción. Entre ellos destacan estudios que emplean aceptores de electrones externos como reguladores del desbalance (McFeeters & Kuang-Hus 1986), la introducción de vías completas de re-oxidación del NADH (Qi y col., 2011), la implementación de una lanzadera tipo transhidrogenasa (Suga y col., 2013), ingeniería metabólica del formato como un dador de electrones en levadura (Geertman y col., 2006) y la expresión de una NADH oxidasa de *Lactobacillus brevis* como regenerador

del NAD^+ (Geueke y col., 2002). Uno de los trabajos más recientes ha documentado la expresión de un gen que codifica para una NADH oxidasa de *Lactococcus lactis* en levadura (Zhang y col., 2012) a fin de disminuir la formación de xilitol (en un 79%) durante la fermentación de la xilosa como consecuencia de equivalentes de NADH. El gen *noxE* expresado en *S. cerevisiae* ha logrado establecer un microciclo que oxida el NADH a NAD^+ utilizando oxígeno y generando agua bajo condiciones de aireación mínimas que no alcanzan a activar la fosforilación oxidativa y no afectan los rendimientos de producción de etanol (lo mejoró en un 39%).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evalúa estudiar la expresión del gen *noxE* de *L. lactis*, que codifica para una NADH oxidasa citosólica, en el metabolismo anaerobio del manitol de *S. cerevisiae*.

1.6.4 Otras optimizaciones para la producción de bioetanol en levadura.

Por otro lado, se han realizado varias modificaciones genéticas en *S. cerevisiae* con el fin de optimizar el rendimiento en la producción de etanol. Entre estas investigaciones destaca la obtención de cepas mutantes de pérdida de función para los genes de la ruta biosintética del glicerol (alternativa para la restitución del NADH) (Zhang y col., 2011). Por otro lado, se ha evaluado la sobreexpresión de los genes que codifican para las enzimas implicadas en tomar el piruvato y llevarlo a etanol: piruvato decarboxilasa 1 (PDC1) y alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1) (Gutiérrez-Lomelí y col., 2008; Tokuhiro, y col., 2009; Ok Yu y col., 2011), y han dado importantes resultados en lo que respecta a la optimización del rendimiento de la producción de etanol en cepas industriales.

1.7 Antecedentes Metodológicos.

A la fecha, los estudios en esta materia han sido abordados en la búsqueda de levaduras naturales con esta capacidad (Lee & Lee 2011; Ota y col., 2013), mientras que las investigaciones de ingeniería genética se han referido a la producción de biocombustibles de primera y/o segunda generación, principalmente desde xilosa (Matsushika y col., 2009; Tanino y col., 2010; Rin Kim y col., 2012). Las cepas obtenidas y evaluadas no han sido apropiadas para su uso a nivel industrial debido a la inestabilidad de los plásmidos, a los altos requerimientos nutricionales, y la falta de estandarización de las condiciones de crecimiento.

En este trabajo se buscaron alternativas que permitieran evitar los inconvenientes reportados y así proyectar una cepa industrial, modificada genéticamente, resistente al etanol, y estable en procesos productivos. El primer punto de innovación fue la elección y el levantamiento de potenciales genes para el desarrollo de una cepa nueva de *S. cerevisiae* capaz de producir bioetanol desde manitol; a saber: síntesis de cDNA de un putativo transportador de polioles propio de *V. albo-atrum*, clonamiento de una manitol deshidrogenasa putativa nativa de levadura S288c (YNR073c), del gen *noxE* de *L. lactis*, de los genes ADH1 y PDC1 de *S. cerevisiae* y del gen de resistencia a higromicina *hph* de *E.coli.*. Los genes YNR073c, ADH1 y PDC1 de levadura, al no contener intrones, fueron amplificados directamente desde el DNA genómico de *S. cerevisiae* S288c, mientras que el gen *hph* fue amplificado desde un plásmido comercial que lo contiene. Por otro lado, el gen *noxE* al ser de origen procarionte, también fue amplificado directamente desde el DNA genómico. No obstante, debido a que la expresión del gen

de *V. albo-atrum* no está caracterizado respecto su expresión ni inducción, fue sintetizado empleando técnicas de PCR recursivo y PCR de extensión utilizando oligonucleótidos de larga extensión y DNA genómico del hongo como templates (Prodromou & Pearl 1992).

En segundo lugar, y en vista de las proyecciones de este trabajo, se decidió integrar y sobreexpresar los genes catabólicos del manitol en el genoma de la cepa industrial resistente a etanol de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ que no consume manitol (Adams y co. 2009). Para ello fue necesario determinar una región genómica, que al ser reemplazada o interrumpida, no afectara el crecimiento normal de la levadura y mostrase apropiados niveles de expresión. Se seleccionó la región YPRCτ3, ubicada en el cromosoma XVI dado que se ha documentado previamente como un *locus* no codificante que presenta niveles de expresión más altos respecto a otras regiones genómicas y cuya interrupción no afecta la homeostasis de la levadura (Bai Flagfeldt y col, 2009; Werner, 2012). Vale destacar que dicha región corresponde a un transposón de tipo Ty4 de baja frecuencia en el genoma de *S. cerevisiae* (Hug & Feldmann 1996). Esta aproximación fue realizada y comprobada por el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile con anterioridad obteniéndose muy buenos resultados para este sitio en la cepa 256, otra levadura industrial (Werner, 2012). En esta oportunidad se evaluará la eficiencia de este sitio en una nueva cepa industrial de *S. cerevisiae*.

Tercero, se decidió seguir la estrategia de co-transformación “DNA assembler” (Shao & Zhao 2009) que permite incorporar vías metabólicas completas en un solo paso

de transformación gracias a los mecanismos moleculares de recombinación propios de la levadura. Para ello, es necesario añadir regiones de homología con el fragmento de DNA al que se quiere unir en los extremos de cada segmento de DNA a transformar, tal como se observa en la Figura 5. Además, para cada gen a introducir, es necesario diseñar un cassette individual de expresión que incluye Promotor-Gen-Terminador utilizando la técnica de PCR de extensión (OE-PCR) (Higuchi y col., 1988; Horton y col., 1989; Bryksin & Matsumura 2010). Se utilizaron diferentes promotores y terminadores en la construcción de los módulos de expresión de cada gen, ambos elementos evaluados previamente para la expresión de genes en *S. cerevisiae* y activos durante la glicólisis (Haulf y col., 2000; Shao & Zhao 2009). Estos elementos reguladores han de ser distintos para impedir eventos de recombinación que puedan llevar a la pérdida de uno o más genes.

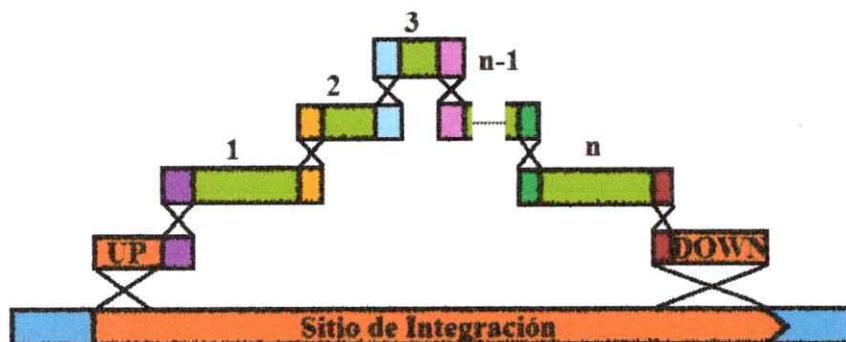


Figura 5.- Sistema de co-transformación en *S. cerevisiae* empleado en este trabajo. Los n módulos a transformar se observan como segmentos de color verde y con extremos de diferente color que representan las secciones homólogas necesarias para que ocurra la recombinación *in vivo*, evento indicado por cruces de color negro. En azul se representa el cromosoma de la levadura, dentro del cual se indica por un bloque naranja el sitio seleccionado para la integración de los módulos. Las regiones rotuladas “UP” y “DOWN”, corresponden a los extremos río arriba y río abajo del sitio de integración, respectivamente.

Para la selección de transformantes se amplificó desde el vector pCDNA, armó y clonó un módulo de resistencia al antibiótico higromicina B usando el gen *hph* de *E.coli* (Gritz & Davies 1983; Blochlinger & Diggelmann 1984).

Finalmente, este proyecto enmarca un gran número de alcances teóricos que conllevan un diseño experimental global que involucra la inserción de varios genes, no obstante, en esta tesis se realizó el levantamiento y la síntesis de los genes, la construcción de sus módulos de expresión, se evaluó la factibilidad de transformar la cepa industrial de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ de Red Star® y se estudió la producción de etanol a partir de manitol, integrando en el sitio YPRCt3 el gen que codifica para una putativa manitol deshidrogenasa.

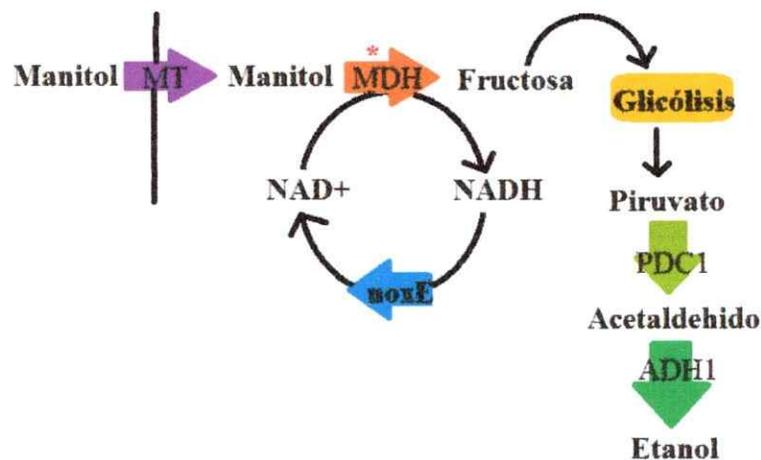


Figura 6.- Esquema global de la estrategia de ingeniería genética para producir etanol empleando manitol como única fuente de carbono y energía. MT: Transportador de Manitol, MDH: Manitol Deshidrogenasa, *noxE*: NADH oxidasa citosólica, PDC1: piruvato decarboxilasa 1, ADH1: Alcohol deshidrogenasa. Las flechas de colores indican sobreexpresión. Nótese el microciclo producido por la enzima *noxE*. Las etapas de transformación abordadas en esta tesis, se marcan con asterisco de color rojo.

HIPÓTESIS

La integración genómica de módulos de expresión de genes de la ruta degradativa del manitol en *Saccharomyces cerevisiae* conduciría a la producción de etanol en esta última levadura.

OBJETIVO GENERAL

Construir una cepa recombinante de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red™ capaz de crecer en manitol y de producir etanol a partir de éste mediante ingeniería genética a través de la utilización de técnicas de “DNA assembler”.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar por PCR y clonar en el vector pBlueScript II SK (+) los genes que codifican para las enzimas: alcohol deshidrogenasa-1 (ADH1), piruvato decarboxilasa-1 (PDC1) y putativa manitol 2 deshidrogenasa (YNR073c) de la cepa de *S. cerevisiae* S288c, y el gen que codifica para NADH oxidasa citosólica (*noxE*) de la cepa *L. lactis subesp cremoris*.
- Sintetizar el cDNA del gen VDBG_02539 de *V. albo-atrum* que codifica para un transportador putativo de polioles empleando técnicas de PCR recursivo y PCR de extensión y clonar el cDNA obtenido en el vector pBlueScript II SK (+).
- Armar módulos de expresión Promotor-Gen-Terminador para cada uno de los genes amplificados y para el gen que codifica para higromicina B fosfotransferasa (*hph*) y clonarlos en el vector pBlueScript II SK (+)
- Transformar la cepa de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ por integración genómica estable del módulo de expresión para *hph* en la región YPRCt3.
- Transformar la cepa de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ por integración genómica estable de los módulos para los genes YNR073c y *hph* en la región YPRCt3.

- Evaluar funcionalmente esta última cepa modificada monitoreando en el cromatógrafo de gases asociado a espectrometría de masas (GC-MS) la producción de etanol en cultivos en matraz que utilizan manitol como única fuente de carbono.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas, plásmidos y DNA genómico.

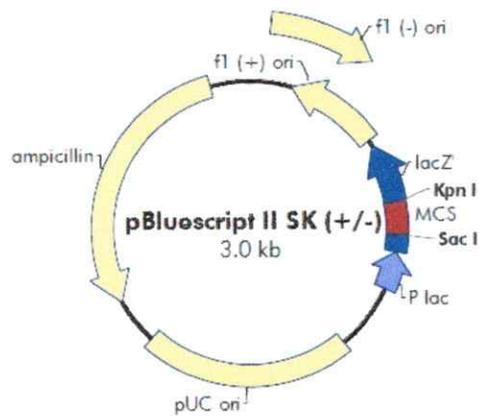
Para los experimentos de transformación se usó la cepa de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ y S288c. En el caso de transformación con plásmidos y su propagación, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5α (Sambrook & Russell 2001). Para el clonamiento en *E. coli* se utilizó el plásmido pBlueScript SK (+) (pBS) de Fermentas. Para clonar el gen *noxE* que codifica para la NADH oxidasa citosólica se extrajo el DNA genómico de la cepa *Lactococcus lactis subsp cremoris* NRRL= B-634. El cDNA del gen VDBG_02539 se sintetizó a partir del DNA genómico de la cepa de *Verticilium albo-atrum* (facilitado por Dr. Jaime Auger, Universidad de Chile). Las cepas generadas y el material genético se detalla en las Tablas 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2.- Cepas mencionadas en este seminario de título.

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|---|--|---------------------------------------|
| <i>E. coli</i> DH5α | F-, φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1 | Sambrook & Russel 2001. |
| <i>S. cerevisiae</i> S288c | MATα, SUC2, gal2, mal, mel, flo1, flo8-1, hap1, ho, bio1, bio6 | Mortimer & Johnston 1986. |
| <i>S. cerevisiae</i> Etanol Red™ de Red Star® sRSc | Nativo | Donada por Dra. María Elena Lienqueo. |
| <i>L. lactis subsp cremoris</i> NRRL=B-634 | Nativo | Zhang y col., 2012. |
| <i>S. cerevisiae</i> ShphRSc | Cepa Red Star resistente a higromicina B. Porta el gen <i>hph</i> . | Esta tesis. |
| <i>S. cerevisiae</i> sMDHc 1 y 2 | Cepa Red Star productora de etanol desde manitol. Porta los genes YNR073c y <i>hph</i> . | Esta tesis. |

Tabla 3.- Plásmidos y DNA genómico utilizado en esta tesis.

| Material Genético | Característica | Referencia |
|--|---|-------------------------------|
| DNA genómico de <i>Verticillium albo-atrum</i> | Nativo | Donado por Prof. Jaime Auger. |
| pBluescript II SK (+) (pBS) | ColE, origen de replicación, Amp ^R . Usado para clonamiento de genes, cDNA y módulos. | Fermentas |
| pcDNA TM 3.1/Hygro (+) | Vector binario para transformar células mamíferas. Hygro ^R (<i>hph</i>) y Amp ^R . Usado para amplificar el gen <i>hph</i> . | Invitrogen |
| pMDH | pBS con ORF del gen YNR073c, manitol deshidrogenasa críptica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c. | Esta tesis. |
| pADH1 | pBS con ORF del gen ADH1, alcohol deshidrogenasa 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c. | Esta tesis. |
| pPDC1 | pBS con ORF del gen PDC1, piruvato decarboxilasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c. | Esta tesis. |
| pNoxE | pBS con ORF del gen <i>noxE</i> , NADH oxidasa citosólica de <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> | Esta tesis. |
| pTM | pBS con cDNA del gen VDBG_02539, Transportador de polioles-5 de <i>Verticillium albo-atrum</i> . | Esta tesis. |
| pSC-MDH | pBS con módulo de expresión en <i>S. cerevisiae</i> del gen YNR073c. | Esta tesis. |
| pSC-HPH | pBS con módulo de expresión en <i>S. cerevisiae</i> del gen <i>hph</i> . | Esta tesis. |
| pSC-ADH | pBS con módulo de expresión en <i>S. cerevisiae</i> del gen ADH1. | Esta tesis. |
| pSC-NoxE | pBS con módulo de expresión en <i>S. cerevisiae</i> de gen <i>noxE</i> | Esta tesis. |
| pSC-PDC | pBS con módulo de expresión en <i>S. cerevisiae</i> de gen PDC1 | Esta tesis. |
| pSC-UP | pBS con fragmento de 594pb de la región YPRCT3 de <i>S. cerevisiae</i> S288c ubicada río arriba del sitio de inserción | Esta tesis. |
| pSC-DOWN | PBS con fragmento de 638pb de la región YPRCT3 de <i>S. cerevisiae</i> S288c ubicada río abajo del sitio de inserción | Esta tesis. |



Sitio de Múltiple Clonamiento (MCS)

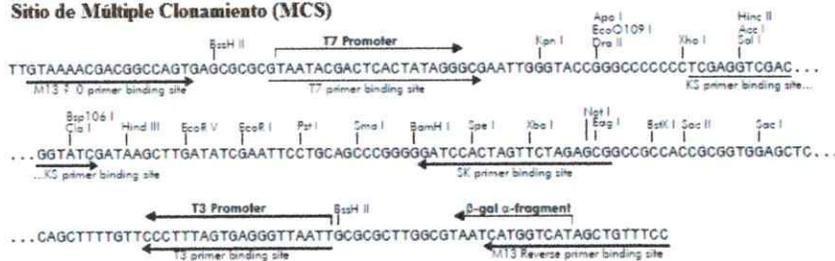


Figura 7.- Vector de clonamiento pBluescript II SK (+). f1 Ori: origen de replicación de DNA de hebra simple derivado del bacteriófago F1. ampicillin: gen de resistencia a Amp. lacZ: región codificante para la β-galactosidasa interrumpida por el sitio de múltiple clonamiento. (Modificado de pBluescript II Phagemid Vectors, Instruction Manual de Stratagene, Cat. #212205, #212206, #212207 y #212208)

2.2 Oligonucleóticos y ácidos nucleicos.

Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis fueron sintetizados por la empresa IDT, Integrated DNA Technologies. La información de cada uno de ellos (nombre, secuencia de nucleótidos y dirección) se indica en detalle en la Tabla 4.

Como marcadores de peso molecular en las electroforesis de DNA se utilizaron; 100bp DNA ladder (NewEngland Biolabs), 1kpb DNA Ladder (NewEngland Biolabs), 1kbp Plus Ladder (Invitrogen), High DNA mass Ladder (Invitrogen) y de 50pb (NewEngland

Biolabs). La cuantificación del DNA se realizó por comparación de intensidad de banda respecto a las bandas del High DNA mass ladder empleando el software ImageJ®.

Tabla 4.- Oligonucleóticos utilizados en este trabajo.

| Nombre | Secuencia (5' a 3') ^a | DNA Blanco o Función | Sentido |
|--------------------------------|--|--|---------|
| Construcción de Módulos | | | |
| TEF1p-f | ACACCATAGCTTCAAAAT GTTTCTACT | Promotor TEF1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| TEF1p-r | AGGCTT TTTCAT TTTGTAAATTAATACT TAG | Promotor TEF1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| HPH-f | TTAATTACAAAATGAAA AAGCCTGAACTCA | ORF del gen hph, pcDNA TM 3.1/Hygro (+) | Directo |
| HPH-r | AGC GAT TTG TCTATT CCT TTG CCC TCG | ORF del gen hph, pcDNA TM 3.1/Hygro (+) | Reverso |
| PGIt-f | GGC AAA GGA ATA GAC AAA TCG CTC TTA A | Terminador TEF1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| PGIt-r | TTT TTC TTC CAG TGC GAG TAT CTT TCTT | Terminador PGI, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| PGK1p-f | ACT CAA GAC GCA CAG ATA TT | Promotor PGK1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| PGK1p-r | ATT TTG TCA TTG TTT TAT ATT TGT TGT AAA AAG TA | Promotor PGK1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| MDH ₂₈₈ -f | AAT ATA AAA CAATGA CAA AAT CAG ACG AAA CA | ORF del gen YNR073c, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| MDH ₂₈₈ -r | GGG CCT GTTCAC ACT TGG TCT AAA ATT TCC | ORF del gen YNR073c, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| Cyct-f | TAG ACC AAG TGT GAA CAG GCC CCT TTT CCT T | Terminador Cyc, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| Cyct-r | ACG ATG AGA GTG TAA ACT GCG AA | Terminador Cyc, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |

| | | | |
|---------|---|--|---------|
| TEF2p-f | ATG GGG CCG TAT ACT TAC ATA TAG TA | Promotor TEF2, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| TEF2p-r | GAT TGG TTC TGC CAT GTT TAG TTA ATT ATA GTT CGT TGA CCG | Promotor TEF2, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| MT-f | ATAATTAACATAAAC <u>ATG</u> GCAGAACCAATCCAGGA TC | cDNA del gen VDBG-02539, <i>Verticillium albo-atrum</i> | Directo |
| MT-r | TTA AGG AGT TAA ATT <u>TAC</u> ACC CTC TTC TCA GAG TCC | cDNA del gen VDBG-02539, <i>Verticillium albo-atrum</i> | Reverso |
| TDH2t-f | AGA AGA GGG TGT AAA TTT AAC TCC TTA AGT TAC TTT AAT GAT T | Terminador TDH2, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| TDH2t-r | GGC GAA AAG CCA ATT AGT GT | Terminador TDH2, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| FBA1p-f | ACT AAG AAA ATG AAG TTG ATG GAT CCA A | Promotor FBA1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| FBA1p-r | TGG GAT AGA CAT TTT GAA TAT GTA TTA CTT GGT TAT GG | Promotor FBA1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| ADH1-f | CAT ATT CAA <u>AATG</u> TCT TAT CCC AGA AAC TCA AAA AG | ORF del gen ADH1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| ADH1-r | GTT AAA AGC ACT <u>TTA</u> TTT AGA AGT GTC AAC AAC G | ORF del gen ADH1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| ENO2t-f | ACT TCT AAA TAA AGT GCT TTT AAC TAA GAA TTA | Terminador ENO2, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| ENO2t-r | ATA GCA TAT TCA TCG AAC AGG TAT | Terminador ENO2, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| PYK1p-f | AAT GCT AGT ATT TTG GAG ATT AAT | Promotor PYK, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| PYK1p-r | AAT TTC AGA CAT TGT GAT GAT GTT TTA TTT GTT TT | Promotor PYK, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| PDC1-f | TAA ATC ATC ATC ACA <u>ATG</u> TCT GAA ATT ACT TTG GGT | ORF del gen PDC1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| PDC1-r | ATT TGA ATT AAC <u>TTA</u> | ORF del gen PDC1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |

| | | | |
|---------|--|---|---------|
| | TTG CTT AGC GTT GGT AGC | | |
| FBA1t-f | GCT AAG CAA TAA GTT AAT TCA AAT TAA TTG ATA TAG T | Terminador FBA1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| FBA1t-r | TAT GTT GGA GGA TAA AGT AAG CTA C | Terminador FBA1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| PDC1p-f | AAC AAC ATG CGA CTG GGT GA | Promotor PDC1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| PDC1p-r | ACT ACG ATT TTC ATT TTG ATT GAT TTG ACT GTG TT | Promotor PDC1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| NoxE-f | AAT CAA TCA AA <u>ATG</u> AAA ATC GTA GTT ATC GGT AC | ORF del gen noxE, <i>L. lactis</i> | Directo |
| NoxE-r | AGA GAT CCG CTT ATT TGG CAT TCA AAG CTG C | ORF del gen noxE, <i>L. lactis</i> | Reverso |
| ADH2t-f | ATG CCA AAT AAGCG GAT CTC <u>TTA</u> TGT CTT TAC | Terminador ADH2, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| ADH2t-r | GTT ATC TCC CTT ATA CTT CTC | Terminador ADH2, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |

Clonamiento de Genes

| | | | |
|---------|--|---|---------|
| MDHg-f | <u>ATG</u> ACA AAA TCA GAC GAA ACA ACA | ORF del gen YNR073c, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Forward |
| MDHg-r | <u>TCA</u> CAC TTG GTC TAA AAT TTC CTT | ORF del gen YNR073c, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| ADH1g-f | <u>ATG</u> TCT ATC CCA GAA ACT CAA AAA | ORF del gen ADH1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| ADH1g-r | <u>TTA</u> TTT AGA AGT GTC AAC AAC GTA T | ORF del gen ADH1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| PDC1g-f | <u>ATG</u> TCT GAA ATT ACT TTG GGT AAA TA | ORF del gen PDC1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Directo |
| PDC1g-r | <u>TTA</u> TTG CTT AGC GTT GGT AGC | ORF del gen PDC1, <i>S. cerevisiae</i> S288c | Reverso |
| NoxEg-f | <u>ATG</u> AAA ATC GTA GTT ATC GGT ACA | ORF del gen noxE, <i>L. lactis</i> | Directo |

| | | | |
|---------|--|------------------------------------|---------|
| NoxEg-r | TTA TTT GGC ATT CAA AGC TGC AA | ORF del gen noxE, <i>L. lactis</i> | Reverso |
|---------|--|------------------------------------|---------|

Síntesis cDNA *Verticillium -albo-atrum*

| | | | |
|-----------|--|--|---------|
| Exint1_fw | ATG GCAGAACCAATCCA GGATCCTCGCAAGACCTC TACGGCCCACGATGAGA AT | Partidor directo que abarca desde el Exón-1 hasta parte del Exón-2 | Directo |
| Exint2_rw | ATGGCAGAACCAATCCA GGATCCTCGCAAGACCTC TACGGCCCACGATGAGA AT | Partidor reverso que hibrida con el partidor Exint1_fw, alargando el Exón-2, hasta alcanzar un tamaño de 90 pb. | Reverso |
| Exint3_rw | CTGGCCTCCAGGTTTCTG CTCAGAGCACCAGAATC ATGTTGCGGTTC | Partidor reverso con cola de homología al producto de la reacción entre los partidores Exint1_fw y Exint2_rw. Agrega 29 pb hasta un producto final de 119 pb | Reverso |
| Ex1_fw | ATGGCAGAACCAATCCA GGATCCT | Producto de PCR recursivo Exón 1 + Exón 2, 119 pb. | Directo |
| Ex2_rw | GGGGGTTGATGATCCTGG CCTCCAGGTTTCTGCT | Producto de PCR recursivo Exón 1 + Exón 2, 119 pb, Agrega cola de homología con el exón 3. | Reverso |
| Ex3_fw | CTGGCCTCCAGGTTGATC ATCAACCCCTCGAAG | Exón 3, <i>V albo-atrum</i> . Agrega cola de homología al exón 2. | Forward |
| Ex3_rw | TGCTGTCCACATTTGCCA AGACATGACAAGAGCA | Exón 3, <i>V albo-atrum</i> . Agrega cola de homología al exón 4 | Reverso |
| Ex4_fw | GCCAAGACATGACAAAA TGTGGACAGCATTGGT | Exón 4, <i>V albo-atrum</i> . Agrega cola de homología al exón 3. | Forward |
| Ex4_rw | GCTGAGCCAACATTACTG TGAACGCAGAGAGTGT | Exón 4, <i>V albo-atrum</i> . Agrega cola de homología al exón 5. | Reverso |
| Ex5_fw | ACTGTGAACGCAGAAAT GTTGGCTCAGCAAATGT | Exón 5, <i>V albo-atrum</i> . Agrega cola de homología al exón 4. | Directo |
| Ex5_rw | TTA CACCCTCTTCTCAGA GT | Exón 5, <i>V albo-atrum</i> | Reverso |

Transformación de Levaduras

| | | | |
|------|--|---------------------|---------|
| UP-f | AAA GGA GGT GCA CGC ATT ATG GAG ACC ACT | Fragmento <i>up</i> | Directo |
| UP-r | TTC CAA GGA GGT GAA GAA CGT CCC CTT TGA | Fragmento <i>up</i> | Reverso |

| | | | |
|-------------|--|---|---------|
| DOWN-f | TTC CAA GGA GGT GAA GAA CGT CCC CTT TGA | Fragmento <i>down</i> | Directo |
| DOWN-r | CGG TAT TAC TCG AGC CCG TAA TAC AAC AGT G | Fragmento <i>down</i> | Reverso |
| UP-r (2) | GTA GAA ACA TTT TGA AGC TAT GGT GTT TCC AAG GAG GTG AAG | Añade a fragmento up cola homóloga a módulo de resistencia a higromicina B | Reverse |
| cHPH-f | AGG GGA CGT TCT TCA CCT CCT TGG AAA CAC CAT AGC TTC AAAA | Añade a módulo de resistencia a higromicina B cola homóloga a fragmento <i>up</i> | Directo |
| cHPH-r (1) | AAC AAG TAC AGT GCT GAC GTC CCA TCT ACT GGA GGC TTC ATG | Añade a módulo de resistencia a higromicina B cola homóloga a fragmento <i>down</i> | Reverso |
| cDOWN-f(1): | GGA CAT AAC TCA TGA AGC CTC CAG TAG ATG GGA CGT CAG CAC TG | Añade a fragmento <i>down</i> cola homóloga a módulo de resistencia a higromicina B | Directo |
| cHPH-r (2) | TGT TAT AAT ATC TGT GCG TCT TGA GTT ACT GGA GGC TTC ATG | Añade a módulo de resistencia a higromicina B cola homóloga a módulo MDH | Reverso |
| cMDH-f (2) | GGA CAT AAC TCA TGA AGC CTC CAG TAA CTC AAG ACG CAC AGA | Añade a módulo MDH cola de homología a módulo de resistencia a higromicina B | Directo |
| cMDH r- (2) | AAC AAG TAC AGT GCT GAC GTC CCA TCA CGA TGA GAG TGT AAA CTG CGA | Añade a módulo MDH cola de homología a fragmento <i>down</i> | Reverso |
| cDOWNf- (2) | AGC TTC GCA GTT TAC ACT CTC ATC GTG ATG GGA CGT CAG CAC TGT A | Añade a fragmento <i>down</i> cola homóloga a módulo MDH | Directo |
| cMDHr - (3) | TGC TCA CCC AGT CGC ATG TTG TTA CGA TGA GAG TGT AAA CTG CG | Añade a a módulo MDH cola de homología con módulo NoxE | Reverso |
| cNOxEf- (3) | AGC TTC GCA GTT TAC ACT CTC ATC GTA ACA ACA TGC GAC TGG GTG AGC | Añade a módulo NoxE cola de homología con módulo MDH | Directo |
| cNOxEr- (3) | ACA AGT ACA GTG CTG ACG TCC CAT CGA CAC ATT CAG GGA AGT CGT TC | Añade a módulo NoxE cola de homología con segmento <i>down</i> genómico | Reverso |
| cDOWNf- (3) | GTA CGA ACG ACT TCC CTG AAT GTG TCG ATG GGA CGT CAG CAC TGT A | Añade cola de homología con módulo NoxE al segmento <i>down</i> | Directo |

^a Se subrayan los codones de inicio y de término en los respectivos partidores

2.3 Cultivo de microorganismos.

2.3.1. *Saccharomyces cerevisiae*.

Los medios de cultivo líquidos empleados para crecer la levadura fueron YM (0,3% p/v extracto de levadura, 0,3% p/v extracto de malta y 0,5% p/v peptona), YPD (1% p/v extracto de levadura, 2% p/v peptona y 2% p/v glucosa) y SC (0,67% p/v Yeast Nitrogen Base, 2% p/v glucosa, sin adición de aminoácidos). Para los cultivos líquidos en manitol se emplearon los medios YPM (1% p/v extracto de levadura, 2% p/v peptona y 2% p/v manitol) y SM (0,67% p/v Yeast Nitrogen Base, 2% p/v manitol, sin adición de aminoácidos). Para el caso de los cultivos sólidos en placa, se agregó bacto-agar a una concentración de 1,5 % p/v a todos los medios. Para la selección de transformantes que derivan de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red™ y S288c se agregó a las placas el antibiótico higromicina B a una concentración final de 100 µg/ml y 75 µg/ml respectivamente. Los cultivos en placa se incubaron a 30 °C, mientras que los cultivos líquidos se crecieron a 32 °C con o sin agitación según corresponda en un agitador orbital (MaxQ 4000, Barnstead, Lab-Line-Iowa, USA).

2.3.1.1 Curvas de crecimiento.

2.3.1.1.1 *Ensayos de crecimiento en Manitol como única fuente de carbono y energía.*

Para evaluar la capacidad de crecer en los medios SM y SC de las cepas de levadura S288c y Ethanol Red™ nativas, así como de los respectivos clones de levadura recombinantes, se dejó un pre-inóculo de 3 ml de medio YM en un tubo Falcon® de 10

ml creciendo durante la noche a 30 °C y 200 rpm. De éste se tomaron 10 µl para inocular un volumen de 60 ml de medio SM o SC en matraces de 200 ml. Los cultivos se hicieron por triplicado para ambas cepas y se incubaron a 32 °C y 200 rpm. Se midió la densidad óptica a 600 nm en espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer) a diferentes tiempos de cultivo. Para evaluar el crecimiento de las levaduras en ausencia de oxígeno, se extrajo el oxígeno de los matraces por simple extracción con jeringa.

2.3.1.1.2 *Ensayos de Inhibición microbiana.*

Para determinar las concentraciones apropiadas de antibiótico higromicina B que se ha de añadir a las placas de cultivo sólidas durante la selección de levaduras recombinantes, se realizó un ensayo de inhibición microbiana en placa. Se dejó crecer un cultivo durante la noche de las cepas S288c y Ethanol Red™ en 10 ml de medio YM en un tubo Falcon® de 45 ml a 30 °C y 200 rpm. Al día siguiente se realizaron, a cada cultivo, diluciones seriadas en órdenes de 10 hasta alcanzar una dilución de 10⁻⁷. Se prepararon placas de medio YM sólido suplementado con higromicina B a cada una de las siguientes concentraciones: 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml y 100 µg/ml. Cada placa se dividió en 8 secciones y se enumeraron desde el 0 hasta el 7 (cada sección correspondió a una dilución, siendo cero el cultivo concentrado y el siete, la dilución 10⁻⁷). Se dejó caer tres microgotas (10 µl) de cada dilución en cada sección según corresponda. Las placas se incubaron a 30 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente se contabilizaron las colonias y se determinó el título en UFC/ml a cada una de ellas.

2.3.2. *Escherichia coli*.

Para el cultivo de *E. coli* se empleó medio Luria Betrani (LB) que contiene 1% p/v triptona, 0,5% p/v de extracto de levadura y 0,5% de cloruro de sodio (NaCl). En caso de cultivos en placa se agregó al medio bacto-agar a una concentración de 1,5% p/v. Para el reconocimiento de clones de *E. coli* transformantes que poseen el plásmido pBS recombinante, se suplementó el medio LB con Amp a una concentración de 100 µg/ml y X-Gal a 30 µg/ml (Sambrook & Russell 2001). Los cultivos líquidos fueron crecidos a 37 °C durante 18 horas con agitación constante (250 rpm) y los cultivos en placa se incubaron a 37 °C sin agitación.

2.3.3. *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

El medio de cultivo líquido empleado para crecer la bacteria *L. lactis* fue el medio tomato juice- yeast extract - milk - peptone (TYPM) el que se preparó mezclando dos soluciones preparadas con antelación. La solución A se preparó agregando 25 g de leche entera en polvo en 200 ml de agua destilada y la solución B mezclando 25 ml de jugo extraído y filtrado de un tomate, 1,25 g de extracto de levadura, 0,75 g de peptona y 25 ml de agua destilada. Ambas soluciones se mezclaron y la solución final se ajustó a pH= 7.0 en pH metro (Corning pH meter Model Cole-Parmer).

Para recuperar el cultivo liofilizado de la cepa de *L. lactis subsp. cremoris* NRRL=B-634, se agregó una pequeña cantidad de polvo liofilizado a un matraz Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 50 ml de medio TYPM y se incubó a 37 °C durante la noche a agitación constante de 200 rpm.

2.4 Purificación de ácidos nucleicos.

2.4.1 *DNA plasmidial.*

La extracción de DNA plasmidial de *E. coli* se llevó a cabo a partir de lo descrito por Sambrook y Russell (2001). El DNA plasmidial empleado para realizar las secuenciaciones se obtuvo mediante el kit de extracción de DNA plasmidial AxyPrep Plasmid Miniprep Kit de Axygene en función de las indicaciones del fabricante. El DNA plasmidial adquirido se guardó a -20° C hasta su utilización.

2.4.2 *Extracción de DNA genómico.*

La extracción de DNA genómico tanto de levaduras como bacterias se realizó mediante el Kit de extracción de DNA genómico Wizard® Genomic DNA Purification Kit.

2.4.2.1 *Saccharomyces cerevisiae.*

Para extraer DNA de levadura se crecieron células obtenidas desde una colonia aislada en placa en 3 ml de medio YM en tubo falcon de 15 ml durante 20 horas a 30 °C y agitación constante de 200 rpm. Al día siguiente se agregó 1 ml de este cultivo en un tubo de 1,5 ml y se centrifugó a 13.000 x g por dos minutos hasta obtener un pellet celular. Se removió el sobrenadante y se re-suspendieron las células en 293 µl de solución a 50 mM de ácido etilendiamiano tetracético, EDTA. A esta suspensión celular se agregaron 7,5 µl de una solución de liticasa a 153 mg/ml (Sigma Cat.# L4025) y se mezcló suavemente 4 veces. El tubo se incubó a 37 °C por una hora para digerir la pared

celular. La muestra se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 13.000 x g por 2 min, luego se removió el sobrenadante. A esta preparación se le extrajo el DNA genómico de acuerdo a las recomendaciones y los protocolos del fabricante. El DNA obtenido se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

2.4.2.2 *Lactococcus lactis subesp. cremoris.*

Para la extracción de DNA genómico de *L. lactis* se dejó un cultivo en matraz en medio TYPM durante la noche. Al día siguiente se tomó 1 ml de cultivo en un tubo de 1,5 ml. Se centrifugó a 13000 x g por dos minutos hasta obtener un *pellet* celular. Posteriormente se removió el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* celular en 450 µl de EDTA al 50 mM, a esta suspensión celular se le agregaron 150 µl de una solución de la enzima lítica lisozima a 12 mg/ml (Sigma Cat.# L7651). La preparación total se incubó a 37 °C por 90 min y posteriormente se centrifugó a 13000 x g por 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue tratado según las indicaciones del fabricante. El DNA genómico obtenido se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

2.4.3 *Purificación de fragmentos de DNA.*

Para la recuperación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa, se cortó con un bisturí la banda de interés procurando extraer la menor cantidad de gel remanente y se purificó empleando el kit QIAEX II Gel Extraction™ (Qiagen) o el kit Gel/PCR DNA Fragments Extraction (Geneaid), según las indicaciones del fabricante.

2.5 Reacciones de PCR.

2.5.1 PCR estándar.

Durante este seminario de título se llevaron a cabo reacciones de PCR estándar con enzima GoTaq® Flexi DNA polimerasa (Promega Cat# M8301) para análisis de clones de *E.coli*, levaduras transformantes y para evaluar la presencia/ausencia de genes. Para la obtención de genes a clonar y de fragmentos (exones, promotor, ORF y terminador), así como para la amplificación de DNA empleado en la transformación se usó la enzima de alta eficiencia KOD Hot Start DNA polimerasa de Novagen.

Las reacciones de PCR con GoTaq® Flexi DNA polimerasa se realizaron a un volumen final de 25 µl. Este ensayo incluía tampón Green GoTaq® Flexi Buffer 1 x pH 8,5, 2mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleótido trifosforilado (dNTP), 1,0 µM de cada partidor, entre 0,1 y 0,4 µg de DNA templado y 1,25 U de enzima GoTaq® Flexi DNA polimerasa. Se utilizó un termociclador PCR gene Mate Series modelo JY-96G y el programa fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación de partidores entre 45 y 57 °C (según menor T_m de los partidores) por 30 s y extensión a 72°C a razón de 1 min por kbp, y por último una elongación final a 72 °C por 5 min.

Las reacciones de PCR con KOD Hot Start polimerasa se realizaron en un volumen final de 30 µl y se empleó entre 20 y 40 ng de DNA templado, 0,6 U de enzima KOD Hot Start polimerasa, 1x de tampón de reacción PCR Buffer for KOD Hot Start DNA Polymerase®, 0,2 mM de cada partidor, 1mM de MgSO₄ y 0,2 mM de cada dNTP. El programa de PCR fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 15 s, alineamiento de partidores

durante 15 s, y elongación a 68 °C a 20 s por kbp, y por último una extensión final a 68 °C por 2 min. Respecto a la temperatura de la etapa de hibridación, generalmente se empleó la menor temperatura de alineamiento de los partidores, a excepción de la amplificación desde DNA genómico donde se restaron 5 grados a la temperatura de alineamiento escogida.

2.5.2 PCR de colonias.

Para evaluar las colonias transformantes de *E. coli* y de *S. cerevisiae* se suspendió la colonia seleccionada en 10 µl de agua en un tubo de PCR. De esta suspensión se tomó un volumen equivalente al correspondiente al DNA templado y se llevó a efecto una reacción estándar de PCR utilizando la enzima GoTaq® Flexi DNA polimerasa.

2.5.3 PCR de elongación (OE-PCR).

La reacción de PCR de extensión (“overlap extensión PCR”, OE-PCR) (Higuchi y col., 1988) se llevó a efecto en dos etapas consecutivas en el termociclador. La primera etapa de ensamble-elongación se realizó en un volumen final de 30 µl e incluyó 80 ng del fragmento de DNA de mayor tamaño y 40 ng del fragmento más corto, 0,6 U de enzima KOD Hot Start polimerasa, tampón de reacción 1x PCR Buffer for KOD Hot Start DNA Polymerase®, 1mM de MgSO₄ y 0,2 mM de cada dNTP. Esta reacción no incluyó oligonucleótidos cebadores pues la extensión ocurre desde los extremos de los fragmentos de DNA unidos durante la etapa de hibridación. El programa utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 min, 15 ciclos de

desnaturalización a 94 °C durante 15 s, hibridación durante 30 s a 45°C y extensión a 72 °C durante 20 s.

La segunda etapa de enriquecimiento, permite amplificar por medio de una reacción de PCR estándar con KOD Hot Start polimerasa los fragmentos ensamblados durante la primera sección. Para ello se llevó el volumen de la reacción de PCR a un volumen final de 50 µl siguiendo el protocolo indicado con anterioridad, con la finalidad de amplificar los ensamblados obtenidos durante la primera etapa de ensamble-elongación.

2.5.4 PCR recursivo y síntesis de cDNA.

Para construir el cDNA del gen VDBG_02539 de *Verticillium albo-atrum* que codifica para un putativo transportador de polioles, se utilizó el DNA genómico de este microorganismo como templado para la amplificación de los exones 3, 4 y 5. Estos exones fueron ensamblados utilizando el protocolo de OE-PCR detallado anteriormente. Por otro lado, el ensamble de los exones 1 y 2 al ser de tan sólo 119 pb fue construido mediante PCR recursivo ("Recursive PCR") (Prodromou & Pearl 1992). Para ello se llevó a efecto una reacción de PCR estándar para KOD Hot Start polimerasa empleando los partidores Ex_int1_fw y Ex_int2_rw sin DNA templado. Este producto fue purificado y utilizado como DNA templado en una subsecuente reacción de PCR estándar para KOD Hot Start polimerasa pero utilizando los partidores Ex_int1_fw y Ex_int3_rw. Esta construcción que fusiona los exones 1 y 2 fue posteriormente enlazada al exón 3 y esta construcción parcial se enlazó al constructo que contenía los exones 4 y 5 fusionados por OE-PCR.

2.6 Análisis de DNA.

2.6.1 Electroforesis en geles de agarosa.

Las electroforesis de DNA se realizaron en una cámara horizontal Horizon-58 (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MA-USA). Cada muestra se mezcló en proporción 5:1 con amortiguador de carga 6x (azul de bromofenol 0,25% p/v en glicerol al 30% p/v) y luego se cargaron en geles de agarosa a una concentración acorde al tamaño del fragmento de DNA (entre 0,7% y 1,5 %). La agarosa se preparó en solución tampón TAE 1X:Tris-Acetato-EDTA (Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1mM) y bromuro de etidio a una concentración final de 0,2 µg/ml. Se incluyó estándar de peso molecular de 1kbp, 100bp y 1kbp plus, según correspondió. Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 100 V (fuente de poder Model 500 de BRL Life technologies, INC., MD-USA). Como solución tampón de corrida, se utilizó tampón TAE 1X. Para finalizar, se visualizó el gel empleando un transiluminador UV Vilber Lourmat (Sigma Aldrich Cat# Z363782) y se fotografió empleando cámara digital.

2.6.2 Digestión con endonucleasas de digestión.

El vector pBS se linearizó incubando con la enzima de restricción FastDigest EcoRV (Eco321) (Fermentas Cat# # FD0303). La reacción de digestión total de 20 µl se llevó a efecto en 1x FastDigest® buffer y se empleó 1 U de enzima por µg de DNA a digerir. La reacción se incubó a 37 °C por 30 min.

2.6.3 Secuenciación de DNA.

Para confirmar mediante secuenciación de DNA el correcto ensamble de los módulos, se prepararon muestras de 20 µl de DNA plasmidial. Las reacciones de secuenciación se realizaron en un secuenciador automático que emplea un kit con terminadores fluorescentes por parte de la empresa Macrogen en Seúl, Corea. Las secuencias obtenidas se analizaron empleando el software *Contig Express*.

2.7 Transformación genética por electroporación.

2.7.1 Ligado de DNA.

Las reacciones de ligación se concretaron según las indicaciones del proveedor de la enzima T4 ligasa (Invitrogen Cat#15224-017). Se empleó el DNA a ligar (inserto) a una razón molar de 3:1 respecto al plásmido pBS, 1U de enzima T4 ligasa y tampón de reacción 1x. La reacción se incubó a 14 °C por 24 horas y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

2.7.2 Transformación de *E.coli*.

2.7.2.1 Preparación de células electrocompetentes.

Las células electrocompetentes de *E.coli* DH5a se prepararon a partir de 5 ml de un cultivo fresco saturado (cultivo overnight). Estos 5 ml se inocularon en 500 ml de medio LB (sin NaCl) contenidos en un matraz para lograr una dilución 1/100 del cultivo original. Esta dilución se creció a 37 °C a agitación vigorosa (190-200 rpm) hasta alcanzar una OD₆₀₀: 0,5-0,65 (fase exponencial). Una vez alcanzada la densidad óptica

esperada se colocó el cultivo en hielo durante 15 a 30 min. Luego, se dividió el cultivo en dos tubos de plástico de 300 ml de capacidad con 250 ml de cultivo cada uno. Se centrifugó en rotor GSA previamente enfriado a 4000 rpm durante 10 min. Una vez centrifugadas las células, se removió todo el sobrenadante y se re-suspendió cada *pellet* celular en 250 ml de glicerol al 10% previamente enfriado. Esta re-suspensión se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min y nuevamente se eliminó el sobrenadante. El *pellet* celular obtenido nuevamente se re-suspendió en 250 ml de glicerol 10% frío, se centrifugó a 4000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante. Luego se juntó el total de ambos *pellet* en 20 ml de glicerol al 10% previamente enfriado en un tubo falcon de 50 ml. Nuevamente se centrifugó la suspensión celular a 4000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, se re-suspendió el *pellet* celular en un volumen final de 2 ml de glicerol al 10% previamente enfriado y rápidamente se alicuotaron 60 μ l de la suspensión celular en tubos de 600 μ l. Las alícuotas fueron guardadas a -80 °C.

2.7.2.2 Electroporación de *E.coli* DH5 α .

Para la transformación celular se descongeló una de las alícuotas y se le agregó 4 μ l de DNA transformante, manteniendo la mezcla en hielo. Se empleó un equipo Cell-Porator® Electroporation System (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MD-USA) en las siguientes condiciones de electroporación: 2 μ F, 4 k Ω y 2,2 kV, baja impedancia, una tasa de carga rápida, un tiempo máximo de 2,5 ms. Luego, a la suspensión de células transformadas se le adicionó 1 ml de medio LB, se transfirió a un tubo Eppendorf® y se incubó a 37 °C durante una hora y agitación constante (200 rpm).

Finalmente se sembraron 2 alícuotas de 100 μ l en placas con LB-Amp-X-Gal y se incubaron a 37 °C hasta la aparición de colonias aisladas. Paralelamente, las células remanentes (800 μ l) se centrifugaron por un min a 12.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), se descartaron 700 μ l de medio y se sembró una tercera placa con los 100 μ l de concentrado celular. De las tres placas obtenidas por cada ligación se seleccionaron las colonias blancas, las que fueron enumeradas y posteriormente estudiadas como primer acercamiento mediante PCR de colonias.

2.7.3 Transformación de *S. cerevisiae*.

2.7.3.1 Preparación de células electrocompetentes.

Para la preparación de células de levadura electrocompetentes se dejó creciendo una colonia aislada de *S. cerevisiae* en 30 ml de medio YM líquido durante la noche a 22 °C y agitación constante (200 rpm). A la mañana siguiente, se adicionaron 30 ml de medio YM fresco al cultivo *overnight* y se incubó por 3 horas más. Luego, se recolectaron las células por centrifugación a 4000 rpm durante 5 min, se lavaron tres veces con 40 ml de agua destilada estéril fría y una vez con 4 ml de solución fría sorbitol 1M. Finalmente, las células se suspendieron en 0,2 ml de sorbitol 1 M y se dividieron en alícuotas de 40 μ l. Estas alícuotas fueron guardadas a 4 °C por un máximo de 2 días.

2.7.3.1 Preparación de DNA transformante.

La preparación del DNA para transformar *S. cerevisiae* se llevó a efecto mezclando fragmentos de DNA obtenidos previamente mediante reacciones de PCR que utilizaron DNA plasmidial con los módulos insertos como DNA templado. Estos amplicones fueron purificados desde geles de agarosa, se determinó su concentración y se mezclaron en las siguientes cantidades: 250 ng de los fragmentos homólogos al sitio blanco de integración y 350 ng de cada módulo de expresión. La mezcla total de DNA de transformación se precipitó agregando dos volúmenes de etanol absoluto e incubando por 16 horas a -20 °C. Al día siguiente, la mezcla de precipitado se centrifugó 10 min a 19.000 rpm y se eliminó el etanol remanente por inversión. Posteriormente, el DNA se secó en estufa a 37 °C por 5 min y una vez seco, se re-suspendió en 4 µl de agua.

2.7.3.2 Electroporación de *S. cerevisiae*.

Para transformar células electrocompetentes de levadura, se agregó a una alícuota de preparado celular el total de los 4 µl de DNA preparado anteriormente. La mezcla se puso en una cubeta de electroporación y se incubó en hielo por 5 min antes de dar el pulso eléctrico de 1,5 kV, 2 µF y 4 kΩ en electroporador Cell-Porator® Electroporation System. Luego, las células fueron centrifugadas a 4000 rpm y lavadas en sorbitol 1M a temperatura ambiente. Finalmente, se volvieron a centrifugar y el *pellet* celular se re-suspendió en 1 ml de sorbitol 1M. Finalmente, se sembraron fracciones de 100 µl en placas YM suplementadas con higromicina B a 75 µg/ml para la cepa S288C y 100 µg/ml para la cepa Ethanol Red™ y se incubaron a 32 °C por dos días y/o hasta la aparición de colonias.

2.8 Curva de producción de etanol y cromatografía de gases.

2.8.1 Curva de producción de etanol de clones recombinantes en condiciones aeróbicas.

Para determinar la producción de etanol en el tiempo se realizó un cultivo de levaduras transformantes en medio líquido. Primero, se tomó una colonia aislada de cada clon transformante crecido en medio YPD sólido suplementado con higromicina B y se suspendió en 10 µl de agua destilada estéril. Luego, se tomó un volumen de 5 µl de esta suspensión celular y se agregó a 50 ml de medio YPM líquido contenido en un matraz Erlenmeyer de 100 ml, de modo de alcanzar una OD₆₀₀ inicial aproximada de 0,1. Este cultivo se incubó a 30 °C y con agitación constante de 95 rpm durante la noche. Al día siguiente, se evaluaron los clones en cuanto a su capacidad de crecer en medio conteniendo manitol y de aquellos clones que sí lo hicieron se colectaron las células por centrifugación, se lavaron una vez en agua destilada estéril, y finalmente fueron suspendidas en 50 µl de agua destilada estéril.

Finalmente, de esta nueva suspensión celular, se tomó el volumen apropiado que permitió llevar tres matraces conteniendo 50 ml de medio YPM y tres matraces con 50 ml de medio YPD fresco, hasta una OD₆₀₀ inicial aproximada de 0,1. Así se evaluó en triplicado la producción de etanol diferencial de los clones transformantes de levaduras en ambos medios conteniendo glucosa (YPD) y manitol (YPM) respectivamente. Estos cultivos se crecieron a 30 °C y 95 rpm durante los próximos 5 días. Específicamente, se monitoreó la producción de etanol en el cultivo a las 16, 50, 72, 96 y 120 horas.

2.8.2 Producción de etanol de clones recombinantes en condiciones anaeróbicas.

Para evaluar la producción de etanol de los clones recombinantes en condiciones anaeróbicas se tomaron 10 µl de una dilución 10^{-4} de un cultivo overnight en medio YPM y se agregaron en un tubo Eppendorf® conteniendo 1 ml de medio SM. A éste se le extrajo el oxígeno y se le dejó en posición vertical durante 3 días a 30 °C y sin agitación. Luego, se midió la concentración de etanol producida por cada uno de los clones.

2.8.3 Cromatografía de gases.

Las muestras a medir se prepararon tomando 1 ml de cada cultivo y se centrifugaron a 12.000 rpm (18.514 x g) por 3 min a fin de decantar las células. Posteriormente, se filtró el sobrenadante empleando papel filtro de 0,22 µm de tamaño de poro. Para medir el etanol contenido en el sobrenadante de las muestras, se agregaron 800 µl de muestra en viales de 1 ml los que fueron puestos en el plató distribuidor del Cromatógrafo de gases (GC) Agilent Technologies 6890N con *Autosampler*, bajo las siguientes condiciones técnicas: muestra inyectada fue de 1 µl (Inyector serie 7683), temperatura inicial de 45 °C, temperatura final de 250 °C, presión de inyección constante a 6,23 psi, flujo total de 12,6 ml/min y gas empleado para el paso helio a un flujo de 0,9 ml/min. El detector del equipo sólo se encendió a la temperatura coincidente con la evaporación del etanol.

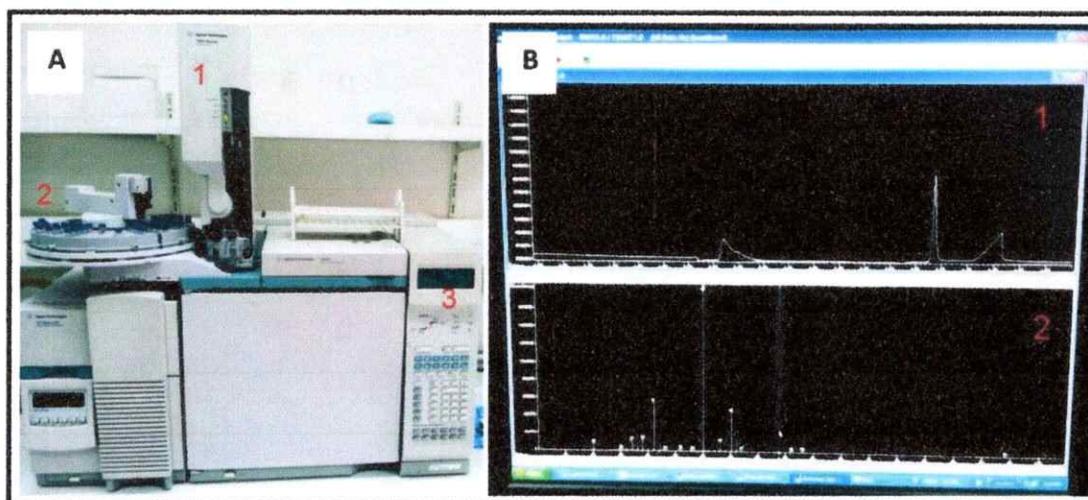


Figura 8.- Cromatografía de gases. A) Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N. 1: Inyector, 2: Plató distribuidor, 3: Pantalla que muestra información del horno del cromatógrafo. B) Programa computacional ChemStation Enhanced Data Analysis. 1: Ejemplo de *peaks* característicos. 2: Detalle de la espectrometría de masa de uno de los compuestos de 1.

El programa de análisis de interfaz e interpretación de los resultados del GC empleado fue MSD Productivity ChemStation Enhanced Data Analysis® de Agilent. Este programa posee una interfaz que genera un *peak* (Figura 8), el cual, mediante una curva de calibración interna para etanol, entrega la concentración de la muestra al medir el área bajo la curva y/o entregando un valor de número que permite calcular el etanol mediante relación matemática sencilla.

3. RESULTADOS

3.1 Levantamiento y clonamiento de genes.

3.1.1 Amplificado y clonamiento de genes de *S. cerevisiae* S288c.

Los genes de interés que serán estudiados y evaluados para su sobreexpresión en la cepa de levadura industrial de *S. cerevisiae* Ethanol Red™, y que se encuentran en el genoma de la cepa estándar S288c son tres: el gen que codifica para la alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1, Gene ID: 854068), el gen que codifica para la piruvato decarboxilasa 1 (PDC1, Gene ID: 850733) y un gen que codifica para una putativa manitol 2 deshidrogenasa (YNR073c, Gene ID: 855810). Por su parte, tanto el gen de la alcohol deshidrogenasa como el gen de la piruvato decarboxilasa han sido estudiados y caracterizados con anterioridad, por lo que se tiene conocimiento de su regulación, expresión y estructura proteica de sus productos génicos (Ciriacy, 1975; Bennetzen & Hall 1982; Pronk y col., 1996). También se han estudiado en ingeniería genética y metabólica, y se ha demostrado que su sobreexpresión beneficia el rendimiento en la producción de bioetanol (Gutiérrez-Lomelí y col., 2008; Tokuhiro y col., 2009; Ok Yu y col., 2011).

El gen YNR073c, que codifica para una putativa manitol 2 deshidrogenasa, no se ha caracterizado a nivel genético, de expresión ni funcional. Por esta razón, su levantamiento constituye un importante acercamiento a su estudio y evaluación, así como a las enormes proyecciones que nacen a merced de este trabajo inicial.

Se emplearon los partidores MDHg-f y MDHg-r para el ORF YNR073c (lo que da un amplicón de 1509 pb), los partidores ADH1g-f y ADH1g-r para amplificar el ORF

ADH1 (que da un amplicón de 1047 pb) y los partidores PDC1g-f y PDC1g-r para el ORF PDC1 (que dan un producto de PCR de 1692 pb). Los amplicones obtenidos fueron purificados desde geles de agarosa y posteriormente clonados en el vector pBS, obteniéndose los plásmidos pMDH, pADH1, pPDC1. La Figura N° 9 muestra una fotografía de un gel de agarosa en el que se han separado los productos de PCR pertenecientes a estos tres genes de la cepa de levadura S288c .

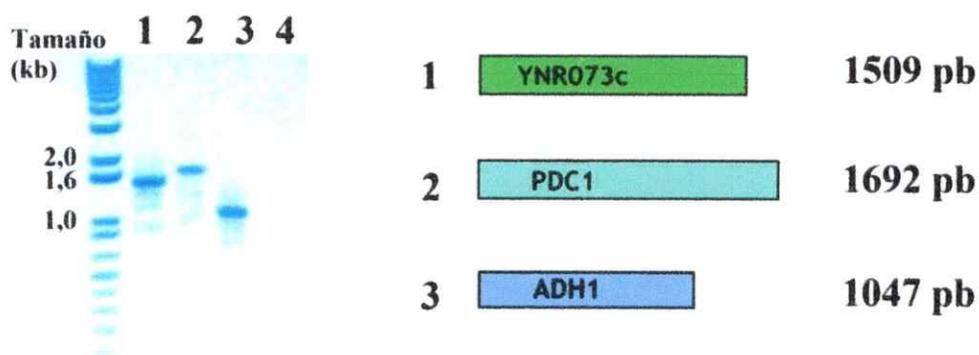


Figura 9.- Levantamiento de genes de interés presentes en la cepa S288c. Para la reacción de PCR se utilizó DNA genómico de la levadura S288c como sustrato templado. **Carriles: 1)** Reacción de PCR de alta fidelidad empleando los partidores MDHg-f y MDHg-r para el ORF del gen YNR073c lo que da un amplicón de 1509 pb. **2)** Reacción de PCR de alta fidelidad empleando los partidores PDC1g-f y PDC1g-r para amplificar el ORF del gen PDC1 lo que da un producto de 1691 pb, **3)** Reacción de PCR de alta fidelidad empleando los partidores ADH1g-f y ADH1g-r para amplificar el ORFADH1 de 1047 pb, **4)** Control negativo sin DNA . A la derecha se observa un esquema explicativo y la relación en tamaño de los tres ORF. Se utilizó como marcador de peso molecular el *ladder* 1kbp plus.

3.1.2 Amplificado y clonamiento del gen *noxE* de *L. lactis*.

Adicionalmente se levantó por PCR de alta fidelidad el gen *noxE* (NADH oxidasa, Gene ID: 8677842) de la bacteria *Lactococcus lactis subesp. cremoris*. Este microorganismo fue pedido a la NRRL (Código: B-634) y enviado en formato polvo

liofilizado de monocultivo. Inicialmente se intentó crecer en medio LB, sin embargo -y luego de varios días de cultivo- no se logró el crecimiento esperado. Adicionalmente, se intentó extraer DNA genómico de este cultivo y directamente del liofilizado, obteniéndose DNA de mala calidad y alto índice de degradación. Para ello, se procedió a buscar en la literatura nuevos medios de cultivo que permitieran el crecimiento de este microorganismo, encontrándose como opción el medio Tomato juice-Yeast extract-Milk-Peptide (TYPM), que contiene jugo de tomate y leche en su preparación. Este medio de cultivo fue crucial en el crecimiento de *L. lactis* pudiéndose obtener un número de células apropiado para garantizar un buen rendimiento y calidad del DNA genómico extraído.

El gen fue amplificado empleando los partidores NoxEg-f y NoxEg-r con lo que se obtuvo un amplicón de aproximadamente 1,3 kpb que corresponde al ORF del gen. Este fue purificado desde geles de agarosa y posteriormente clonado en el vector pBS obteniéndose el plásmido pNoxE. La Figura 10 muestra un resumen de los resultados obtenidos, en ésta se aprecia el levantamiento del gen desde DNA genómico de *L. lactis* y la evaluación del clonamiento de éste en el vector pBS.

La Tabla 5 muestra el detalle de los genes clonados, los partidores empleados y los plásmidos obtenidos.

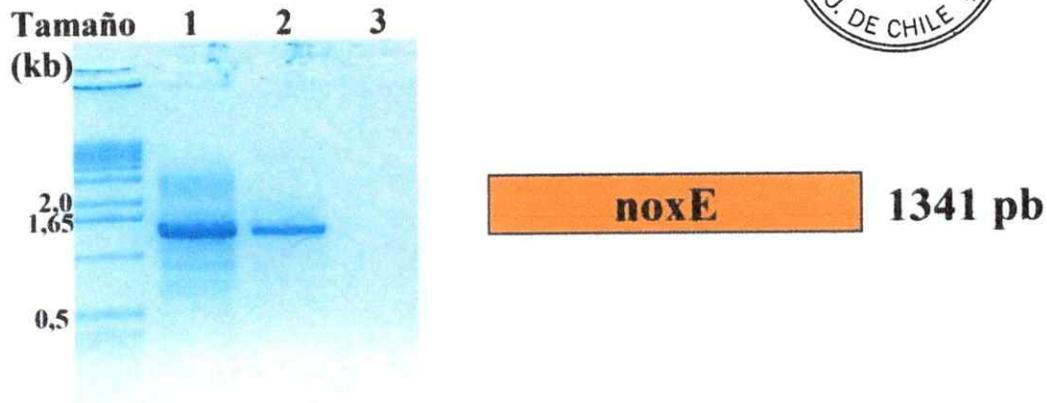


Figura 10.- Levantamiento del gen *noxE* que codifica para una NADH oxidasa citosólica. Carriles, 1) Amplificación demostrativa por PCR estándar del gen *noxE* desde DNA genómico de *L. lactis*. Se observa una banda de aproximadamente 1,3 kpb correspondiente al tamaño esperado del gen, 2) Amplificación demostrativa por PCR estándar del gen *noxE* clonado en el plásmido pBS, 3) Control negativo sin DNA. A la derecha se observa un esquema representativo del ORF del gen *noxE*. Se utilizó como marcador de peso molecular el *ladder* 1 kpb.

Tabla 5.- Resumen del clonamiento de genes realizados en esta tesis.

| Gen | DNA templado | Partidor Directo | Partidor Reverso | Amplicón tamaño (kb) | Plásmido obtenido |
|--------------------|----------------------------------|------------------|------------------|----------------------|-------------------|
| YNR073c | DNA genómico de S288c | MDHg-f | MDHg-r | 1509 | pMDH |
| ADH1 | DNA genómico de S288c | ADH1g-f | ADH1g.r | 1692 | pADH1 |
| PDC1 | DNA genómico de S288c | PDC1g-f | PDC1g-r | 1047 | pPDC1 |
| <i>noxE</i> | DNA genómico de <i>L. lactis</i> | NoxEg-f | NoxEg-r | 1341 | pNoxE |

3.2 Síntesis de cDNA del gen que codifica para un putativo transportador de polioles de *Verticillium albo-atrum*.

Dentro del análisis planteado en la introducción, se mencionó la necesidad de contar con un gen que codifique para un transportador de manitol y que potencialmente pueda expresarse correctamente en la membrana plasmática de la cepa de *S. cerevisiae* Ethanol Red™. Fue así como se encontró en la base de datos de la NCBI la secuencia del gen VDBG_02539 (Gene ID: 9535451) del microorganismo *Verticillium albo-atrum* de alta cercanía evolutiva con *S. cerevisiae*. Este gen se encuentra en la región NW_003315036.1 del genoma de *V. albo-atrum*, específicamente entre los nucleótidos 74600 y 77200. El gen completo es de aproximadamente 2385 pb, posee 5 exones que en conjunto constituyen un ORF de 1905 pb, cDNA que codificaría para una proteína putativa del tipo transportador de polioles con afinidad a manitol de 634 aa y cuya estructura predicha por modelamiento estaría muy cercana a un transportador de manosa de *S. cerevisiae* (Modeller) (Figura 13). Sólo se ha inferido su existencia mediante análisis de homología (Ma y col., 2008). Por esta razón, y dada la dificultad técnica que conlleva el estudio de un gen no caracterizado, sumado a lo complejo que resulta la obtención del mRNA de este gen y su inducción, es que se procedió a sintetizar el cDNA.

Inicialmente se propuso armar el cDNA sólo mediante OE-PCR, sin embargo, debido al tamaño de los exones 1 y 2 -de 23 y 96 pb respectivamente- se decidió armar primero un constructo que fusione estos dos exones utilizando la técnica de PCR recursivo de alta fidelidad (síntesis por partidores). Posteriormente, se procedió a enlazar esta primera fusión con los demás exones por OE-PCR.

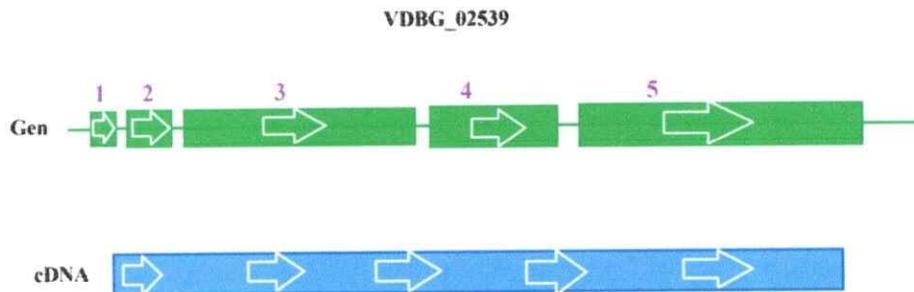


Figura 11.- Esquema del gen VDBG_02539 para un putativo transportador de polioles de *V.albo atrum*. En verde se observa un diagrama explicativo del gen completo de 2385 pb. Con morado se enumeran los cinco exones del gen en concordancia relativa con el tamaño de cada exón. En azul se observa el cDNA (1905 pb) del gen correspondiente a los cinco exones fusionados.

Inicialmente se utilizaron los partidores Exint1_fw (directo) y Exint2_rw (reverso), ambos de 54 pb, para obtener un fragmento intermedio de 90 pb. Esta primera reacción de PCR se logró gracias al diseño de la secuencia de estos oligonucleótidos y no se utilizó DNA templado como sustrato. Por su parte, el partidor directo Exint1_fw coincide en sus primeras 23 pb con la totalidad de la secuencia del exón 1 del gen VDBG_02539, mientras que las 31 pb restantes corresponden en parte a la secuencia del exón 2. De igual modo, el partidor reverso Exint2_rw, se condice con las 54 primeras bases del exón 2, por lo que hibrida perfectamente con el partidor directo en sus primeros 31 nucleótidos (Figura 11). Una vez obtenido el producto intermedio de 90 pb, éste se ocupó como templado para una segunda reacción de PCR empleando el mismo partidor directo Exint1_fw y el partidor reverso Exint3_rw de 47 pb; este último contiene una región de hibridación con el producto de 90 pb de 18 nucleótidos y una

“cola” de 29 pb que completa la obtención del producto final de 119 pb que corresponde al exón 1 y 2 fusionados.

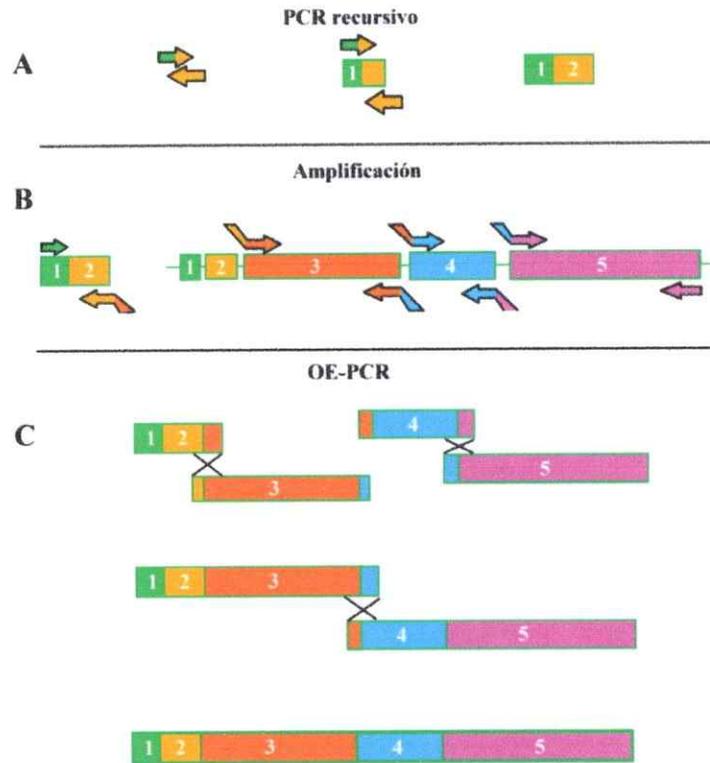


Figura 12.- Metodología empleada para la construcción del cDNA del gen VDBG_02539. A) Esquema representativo de la primera etapa desarrollada para la síntesis del cDNA de interés. Inicialmente se obtuvo un fragmento parcial de 90 pb por hibridación y extensión de los partidores Exint1_fw y Exint2_rw. Este fragmento inicial contenía el exón 1 completo y parte del exón subsecuente. Posteriormente, empleando los partidores Exint1_fw y Exint3_rw y el producto de 90 pb como templado, se obtuvo un producto final de 119 pb que corresponde a la fusión completa entre los exones 1 y 2 del cDNA. B) Esquema representativo de la segunda etapa metodológica para la obtención del cDNA. Se amplificó por PCR de alta fidelidad y empleando partidores con segmentos de homología cada uno de los exones restantes (3, 4 y 5) y el producto de fusión de los exones 1 y 2 de 119 pb. C) Esquema representativo de la última etapa experimental para la síntesis del cDNA donde inicialmente se obtuvieron dos productos de fusión parciales por OE-PCR: uno de 1139 pb que correspondió a la fusión entre los exones 4 y 5, y un producto de 766 pb que corresponde a la fusión de los exones 1, 2 y 3. Finalmente, ambos productos parciales fueron hibridados por OE-PCR, obteniéndose el producto de cDNA final de 1905 pb.

Una vez finalizada la etapa de PCR recursivo, se procedió a la fusión del resto de los exones empleando la técnica de PCR de extensión. Para ello, se amplificaron los exones restantes por PCR de alta fidelidad desde DNA genómico de *V.albo-atrum* empleando partidores que posean “colas” homólogas a los exones adyacentes. De igual modo se amplificó el fragmento obtenido por PCR recursivo (Figura 12 A). Para armar el cDNA total, se fusionaron en primera instancia los exones 4 y 5 para dar un producto de 1139 pb, y luego el exón 3 con el producto de PCR recursivo (exón 1 + exón 2) dando un producto de 766 pb.

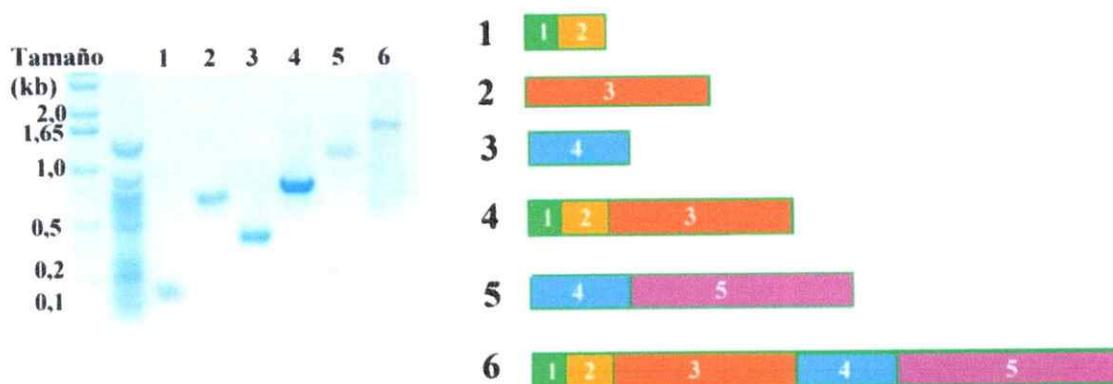


Figura 13.- Resumen de resultados obtenidos en la síntesis de cDNA por PCR recursivo y PCR de extensión.- Carriles, 1)Producto de PCR recursivo que corresponde a la fusión de los exones 1 y 2 (119 pb), 2) Producto de PCR del exón 3 de 647 pb, 3) Producto de PCR del exón 4 de 364 pb, 4) Producto de OE-PCR que fusiona el fragmento de 119 pb con el exón 3, dando un producto de 766 pb, 5) Producto de OE-PCR que fusiona el exón 4 con el exón 5 dando un producto de 1139 pb, 6) Producto final que corresponde al cDNA del transportador de poiloos de *V.albo-atrum* de 1905 pb.

Finalmente ambas fusiones parciales fueron unidas por OE-PCR para obtener el producto final de 1905 pb. El cDNA fue posteriormente clonado al vector pBS, obteniéndose el plásmido pTM. Los experimentos de construcción de este cDNA se realizaron con la colaboración del estudiante de doctorado José Duguet, y los resultados de la construcción total se muestran en la Figura 13.

3.3 Construcción de módulos de expresión de genes de producción de bioetanol desde manitol para *S. cerevisiae*.

3.3.1 Amplificado e hibridación de fragmentos.

Inicialmente se amplificó cada fragmento constituyente, a saber, promotor, ORF de cada gen y terminador, empleando la enzima KOD Hot Start DNA polimerasa de alta fidelidad para evitar errores, de acuerdo a lo indicado en la Tabla 6. Los promotores y terminadores se amplificaron desde DNA genómico extraído de la cepa de *S. cerevisiae* S288c. Los ORF de los genes de producción de bioetanol a partir de manitol y del gen *hph* de resistencia a higromicina, fueron amplificados desde los plásmidos pcDNATM3.1/Hygro (+) (gen *hph*), pMDH (gen que codifica para una putativa manitol deshidrogenasa, YNR073c), pADH1 (gen alcohol deshidrogenasa 1, ADH1), pPDC1 (gen piruvato decarboxilasa 1, PDC1) y pNoxE (gen NADH deshidrogenasa, *noxE*). En cada reacción de PCR se usó partidores específicos, según se indica en detalle en la Tabla 6 portadores de una “colita” de homología de tamaño suficiente para favorecer la hibridación de los fragmentos constituyentes adyacentes en el respectivo módulo (12-15

pb). Los productos de PCR obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa para luego ser aislados y purificados de los mismos. Cada fragmento –portador-

Tabla 6.- Fragmentos amplificados para la construcción de cada módulo y partidores usados en cada reacción.

| Módulo | Fragmento amplificado (tamaño pb) | Partidor Directo | Partidor Reverso |
|--|--|-----------------------|-----------------------|
| m-HPH (de resistencia a higromicina) | Promotor Factor de elongación traduccional 1, TEF1 (417) | TEF1p-f | TEF1p-r |
| | Gen <i>hph</i> (1024) | HPH-f | HPH-r |
| | Terminador Glucosa fosfato isomerasa, PGI (396) | PGIt-f | PGIt-r |
| m-MDH | Promotor Fosfoglicerato quinasa, PGK1 (757) | PGK1p-f | PGK1p-r |
| | Gen YNR073c (1509) | MDH ₂₈₈ -f | MDH ₂₈₈ -r |
| | Terminador Citocromo C, Cyc (302) | Cyct-f | Cyct-r |
| m-ADH1 | Promotor Fructosa 1,6 bis-fosfato aldolasa, FBA1 (843) | FBA1p-f | FBA1p-r |
| | Gen <i>adh1</i> (1047) | ADH1-f | ADH1-r |
| | Terminador Enolasa 2, ENO2 (418) | ENO2t-f | ENO2t-r |
| m-PDC1 | Promotor Piruvato quinasa, PYK1 (1000) | PYK1p-f | PYK1p-r |
| | Gen <i>pdc1</i> (1692) | PDC1-f | PDC1-r |
| | Terminador Fructosa 1,6 bis-fosfato aldolasa, FBA1 (416) | FBA1t-f | FBA1t-r |

| | | | |
|---------------|---|---------|---------|
| m-NoxE | Promotor Piruvato decarboxilasa 1, PDC1 (805) | PDC1p-f | PDC1p-r |
| | Gen <i>noxE</i> (1341) | NoxE-f | NoxE-r |
| | Terminador Alcohol deshidrogenasa 2, ADH2 (560) | ADH2t-f | ADH2t-r |

de los segmentos de homología- fue unido a sus equivalentes de a pares, por ejemplo, se hibridó un terminador con su respectivo gen en una primera reacción de PCR de elongación (OE-PCR) y este producto inicial, luego de ser purificado, se hibridó a su respectivo promotor (fracción restante del módulo). En la Figura 14 se muestra un esquema de cada uno de los módulos construidos y clonados en el vector pBS.

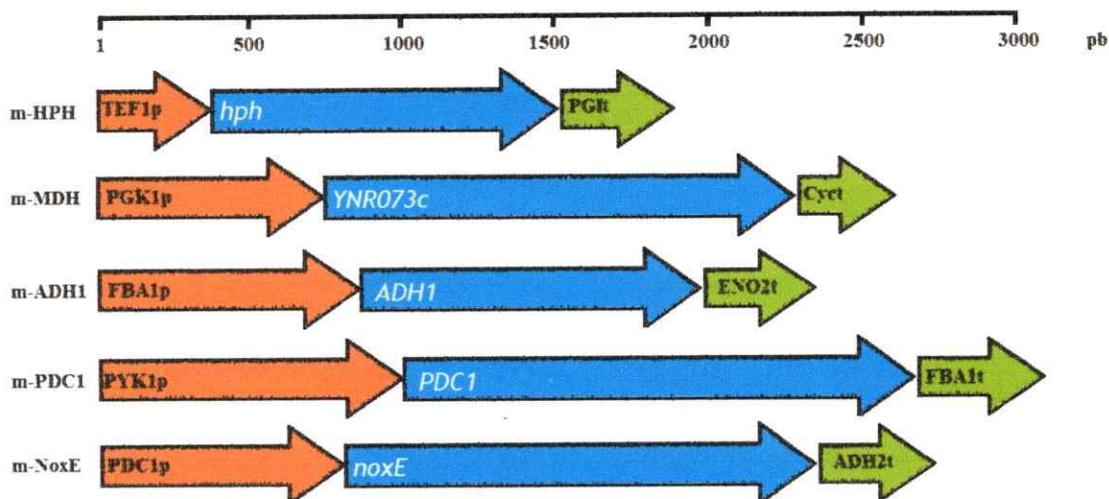


Figura 14.- Módulos de expresión construidos. Esquema de módulos de expresión en *Saccharomyces cerevisiae* mencionados en este trabajo. El nombre de cada módulo se muestra al costado izquierdo precedido por la letra m. Los promotores se observan de color naranja, genes en azul y terminadores en verde. Sobre las figuras se indica la escala en pares de bases (pb).

A modo de ejemplo, se observa en la Figura 15 la migración en un gel de agarosa de los fragmentos obtenidos para la construcción del módulo o cassette de expresión del gen YNR073c que codifica para una putativa manitol deshidrogenasa. En el gel se muestran los amplificadores de PCR para cada uno de los componentes del módulo y se indican sus respectivos tamaños; promotor del gen de la enzima 3-fosfoglicerato quinasa (PGK1p, Gene ID: 850370), ORF del gen YNR073c y terminador del gen de la citocromo C isoforma 1 (Cyc1, Gene ID: 853507). Adicionalmente, se muestra el producto de la unión entre el gen y el terminador (unión MDH-Cyc1) y la unión entre MDH-Cyc1 con PGK1p formando el módulo completo.

Los módulos de expresión de los genes restantes ADH1, PDC1 *noxE* (Gene ID: 4796799) y *hph* (que confiere resistencia a higromicina B), se construyeron de la misma manera, siguiendo los tamaños esperados de cada fragmento y finalmente la unión entre ellos. El módulo ADH1 comprende la hibridación del promotor de fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa (FBA1, Gene ID: 853805) de *S. cerevisiae* de 843 pb, con el ORF del gen ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1) de la cepa de levadura S288c de 1047 pb y el terminador ENO2 (Enolasa 2, Gene ID: 856579) de *S. cerevisiae* de 418 pb. En su construcción, en primer lugar se construyó el fragmento FBA1p-ADH1 de 1890 pb y luego el módulo completo (FBA1p-ADH1-ENO2t) con un tamaño de 2308 pb. Por su parte, el módulo PDC1 se formó al enlazar el promotor de piruvato quinasa (PYK1, Gene ID: 851193) de *S. cerevisiae* de 1000 pb con el ORF del gen PDC1 de la cepa S288c de 1692 pb (Piruvato decarboxilasa, Gene ID: 850733) y el terminador fructosa 1,6 bis-fosfato aldolasa (FBA1, Gene ID: 853805) de *S. cerevisiae* y de un tamaño de

416 pb. Para su construcción primero se creó el fragmento PYK1p-PDC1 de 2692 pb, al que se le hibridó el terminador, obteniéndose un cassette final de 3108 pb. Estos dos módulos de expresión fueron construidos -al igual que el cassette MDH de manitol deshidrogenasa- con elementos 100% provenientes de levadura, por lo que constituyen construcciones cisgénicas.

Los módulos *m*-HPH y *m*-NoxE, también contienen elementos regulatorios (promotores y terminadores) provenientes de levadura, sin embargo sus genes son respectivamente de origen plasmidial y bacteriano, lo que los transforma en constructos de expresión transgénicos. Para la construcción del módulo de resistencia a higromicina B, se unió el promotor del gen del factor de elongación traduccional 1 (TEF1p, Gene ID: 856195) con el gen *hph* de *E.coli* pero amplificado desde el vector pcDNATM3.1/Hygro (+) y el terminador del gen de la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa (PGII, Gene ID: 852495). La suma de las tres secciones nos da un total de 1837 pb, y que corresponden a 417 pb del promotor, 1024 del ORF del gen *hph* y 396 del terminador. Este módulo se construyó por las dos posibles vías, es decir, enlazando el gen al promotor primero y/o al terminador primero y luego a la sección siguiente sólo para comparar la eficiencia del método.

El módulo de la NADH oxidasa de *L. lactis*, *noxE*, se fabricó utilizando el promotor del gen de la enzima piruvato decarboxilasa de 805 pb (PDC1p, Gene ID: 850733), el ORF del gen *noxE* de 1341 pb y el terminador de gen que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa 2 de 560 pb (ADH2t, Gene ID: 855349). Este módulo se

construyó hibridando en una reacción de OE-PCR inicial el promotor con el gen, obteniéndose un fragmento parcial PDC1p-noxE de 2146 pb, a este

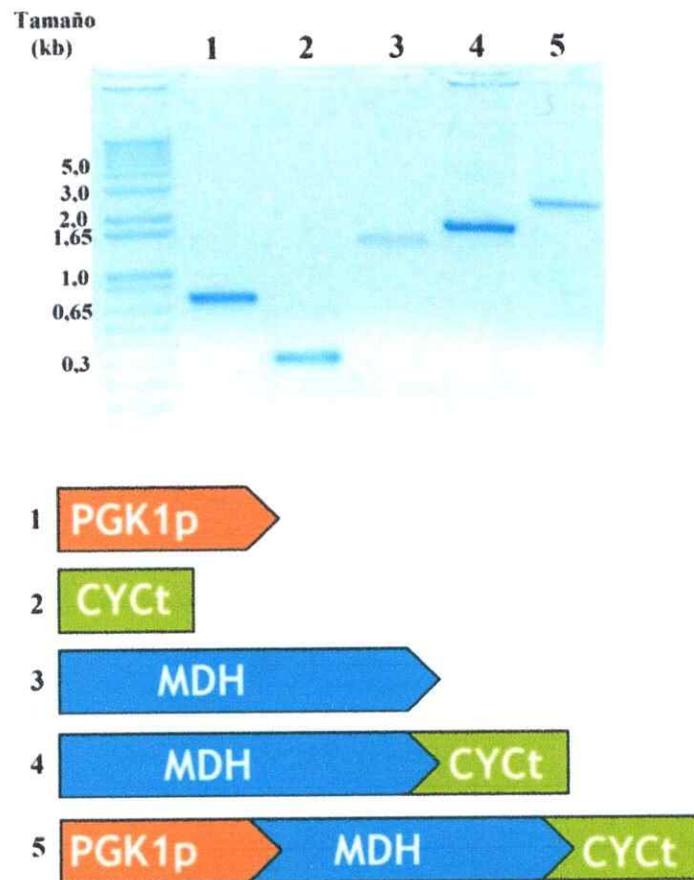


Figura 15.- Resultados de PCR de elongación del módulo m-MDH. Arriba se presenta una fotografía de un gel de agarosa al 1% con lo fragmentos utilizados para la construcción del módulo. Se observa el marcador de DNA Ladder 1 kb plus, **carriles 1)** Promotor PGK1 (PGK1p-f y PGK1p-r, 757 pb), **2)** Terminador CYC (Cyc2-f y Cyc2-r, 302 pb), **3)** ORF del gen YNR073c (MDH) que codifica para una Manitol deshidrogenasa putativa de la cepa S288c (MDH-f y MDH-r, 1509 pb), **4)** gen MDH más terminador CYC (MDH-f y Cyc2-r, 1811 pb), **5)** Módulo MDH completo, promotor PGK1 + MDH + terminador CYC (PGK1p-f y Cyc2-r, 2568 pb). Abajo se muestra un esquema representativo de cada fragmento amplificado con un número correlativo a su carril en el gel de agarosa. En naranja se muestra el promotor PGK1, en azul el ORF del gen YNR073c y en verde el terminador CYC. Se utilizó 1 kbp plus como marcador de peso molecular.

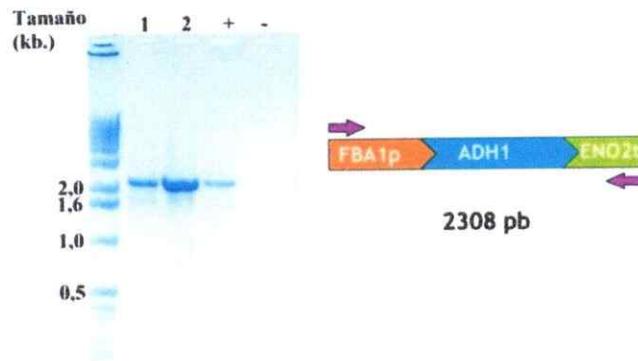
constructo se le enlazó el terminador para obtener así el módulo completo de 2706 pb que contiene promotor, gen y terminador.

El módulo de expresión del cDNA del transportador de *Verticillium albo-atrum* se encuentra actualmente en proceso de construcción por parte del estudiante de doctorado José Duguet. Se construirá empleando el promotor del factor de elongación traduccional 2 de 575 pb (TEF2p, Gene ID: 852415), el cDNA construido previamente por PCR recursivo y OE-PCR, y el terminador del gen que codifica para la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de 401 pb (TDH2t, Gene ID: 853465). Estos fragmentos parciales fueron amplificados y purificados en este trabajo de tesis.

3.3.2 Clonado de módulos en vector pBluescript SK II (+).

Cada módulo o cassette de expresión construido fue ligado de forma independiente al vector pBluescript II SK (+) (pBS) digerido previamente con la endonucleasa de restricción *EcoRV*. La Figura 9 muestra un diagrama de este vector y se indica con color rojo el sitio de múltiple clonamiento (MCS), que es además, detallado en la parte inferior del esquema, pudiéndose notar claramente el sitio de corte de esta enzima cuyo producto se caracteriza por dejar extremos romos. El producto de la reacción de ligado fue utilizado para transformar células de *E. coli* electrocompetentes, donde se seleccionaron colonias de color blanco Amp resistentes. Para confirmar la presencia del módulo en las potenciales colonias transformantes de color blanco, se hizo PCR de colonias con partidores específicos de cada módulo.

A



B

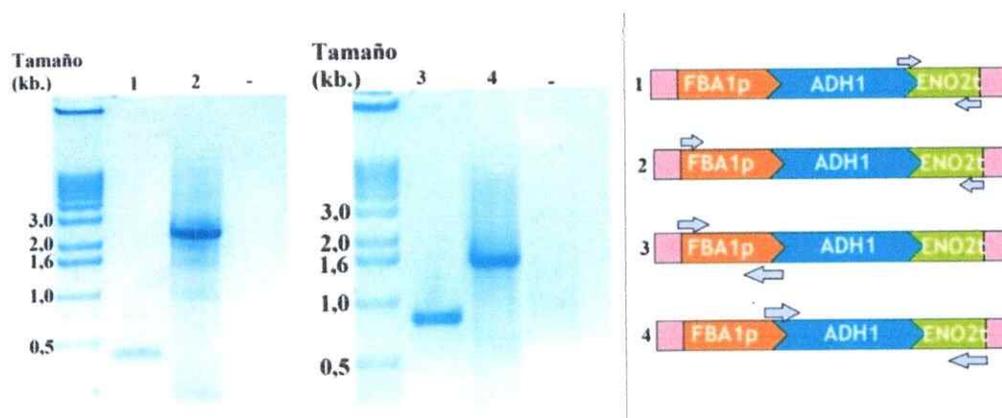


Figura 16.- PCR para identificar clones de *E. coli* con el módulo m-ADH en pBS. A) Amplicones obtenidos luego de realizar reacciones con partidores que flanquean el módulo completo en 2 colonias transformadas con el módulo ADH en el vector pBS. Se observa que ambas colonias resultaron ser positivas con un amplificado de aproximadamente 2,3 kpb usando los partidores FBA1p-f (directo) y ENO2t-r (reverso). Estas colonias corresponden al carril 1 y 2 respectivamente. Como control positivo se usó el constructo armado sin clonar como templado, y control negativo sin DNA. **B)** Resultados de PCR utilizando como templado DNA plasmidial extraído desde la colonia 1 para confirmar la presencia del módulo completo en el plásmido. Se observan dos reacciones de PCR diferentes para el mismo clon (número 1, panel A); carriles 1: Terminador ENO2 completo (partidores ENO2t-f y ENO2t-r, tamaño de 0,4 kpb), 2: Control de amplificado en PCR de colonia (partidores FBA1p-f y ENO2t-r, tamaño aproximado de 2,5 kb), 3: Promotor FBA1 (partidores FBA1p-f y FBA1p-r, tamaño aproximado de 0,8 kb), 4: Construcción parcial ADH1+ENO2t (partidores ADH1-f y ENO2t-r, tamaño aproximado de 1,6 kb). A la derecha se esquematiza la posición de los amplificados respecto al módulo. Se utilizó marcador de peso molecular 1kbp plus.

En la Figura 16 se muestra a modo de ejemplo la detección por PCR exploratorio de colonias del módulo de expresión ADH1 en las colonias transformantes de *E. coli*. Se obtuvieron dos colonias blancas, y primero se las analizaron para chequear la presencia del módulo completo utilizando partidores que flanquean el módulo en su totalidad (FBA1p-f y ENO2t-r, y que dan un producto de PCR de 2308 pb (Figura 16 A). Se obtuvo un resultado positivo en ambas colonias a analizar. De manera aleatoria se seleccionó la colonia número 1 a la cual se le extrajo DNA plasmidial y se analizó por PCR estándar para confirmar la presencia y correcta estructura del módulo dentro del vector. El plásmido derivado de pBS que contiene el módulo ADH1 se denominó pSC-ADH. De la misma forma se procedió con los otros módulos para obtener los plásmidos pSC-MDH, pSC-PDC1, pSC-HPH y pSC-NoxE. Cada inserto de estos plásmidos, correspondientes a los módulos de expresión para los genes necesarios para producir etanol desde manitol algal y del gen *hph* de *E.coli* fueron secuenciados para confirmar su correcta construcción.

3.4 Transformación de *S. cerevisiae*.

3.4.1 Cepa resistente al antibiótico higromicina B.

Con la finalidad de emplear como marcador de selección la resistencia al antibiótico higromicina B, se evaluó cualitativamente la resistencia intrínseca al antibiótico de las cepas S288c y Ethanol Red™ de *S. cerevisiae* y se determinó que la concentración de antibiótico a usar para la selección en placa de clones transformantes que derivaran de la cepa S288c es de 75 µg/ml, mientras que para la cepa Ethanol

Red™ se decidió utilizar 100 µg/ml puesto que mostró mayor resistencia al antibiótico que la cepa estándar de laboratorio.

Para evaluar el sistema de selección y de transformación por DNA *assembler* que ya había sido comprobado en la cepa estándar de laboratorio S288c y en la cepa industrial de *S. cerevisiae* 256 (Werner, 2012), se transformó la cepa Ethanol Red™ introduciendo sólo el módulo de resistencia a higromicina B, según se observa en el esquema de la Figura 17. En este esquema se ejemplifica el sitio de integración y el orden de los fragmentos una vez ensamblados e integrados en el cromosoma de la levadura. Para ello, antes de la transformación se amplificó utilizando DNA plasmidial como templado y la enzima KOD Hot Start DNA polimerasa, utilizando los partidores que se indican en la Tabla 7, los fragmentos necesarios para la integración dirigida del módulo m-HPH en el cromosoma de la levadura, que corresponden a una región de 594 pb ubicada río arriba del sitio de integración (*up*) y de una región de 638 pb río abajo al sitio de integración (*down*).

Los partidores utilizados en la amplificación de cada fragmento contienen una región o “colita” adicional de 25 pb, que en conjunto con los demás amplificados, crean una región de 50 pb de homología con el fragmento aledaño con el que se desea ensamblar en la transformación.

Tabla 7.- Combinaciones de partidores usadas para la amplificación de fragmentos para cada transformación.

| Transformación | Módulo o fragmento amplificado (tamaño pb) | Plásmido usado para amplificar | Partidor directo | Partidor reverso |
|----------------------------------|---|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1, HygR | Up (594) | pSC-UP | Up-f | Up-r (2) |
| | m-HPH (1837) | pSC-HPH | cHPH-f | cHPH-r (1) |
| | Down (638) | pSC-DOWN | cDOWN-f(1) | DOWN-r |
| 2, Manitol Deshidrogenasa | Up (594) | pSC-UP | Up-f | Up-r (2) |
| | m-HPH (1837) | pSC-HPH | cHPH-f | cHPH-r (2) |
| | m-MDH (2568) | pSC-MDH | cMDH-f (2) | cMDH r- (2) |
| | Down (638) | pSC-DOWN | cDOWNf-(2) | DOWN-r |
| 3, NoxE | Up (594) | pSC-UP | Up-f | Up-r (2) |
| | m-HPH (1837) | pSC-HPH | cHPH-f | cHPH-r (2) |
| | m-MDH (2568) | pSC-MDH | cMDH-f (2) | cMDHr-(3) |
| | m-NoxE (2706) | pSC-NoxE | cNOxEf-(3) | cNOxEr-(3) |
| | Down (638) | pSC-DOWN | cDOWNf- (3) | DOWN-r |

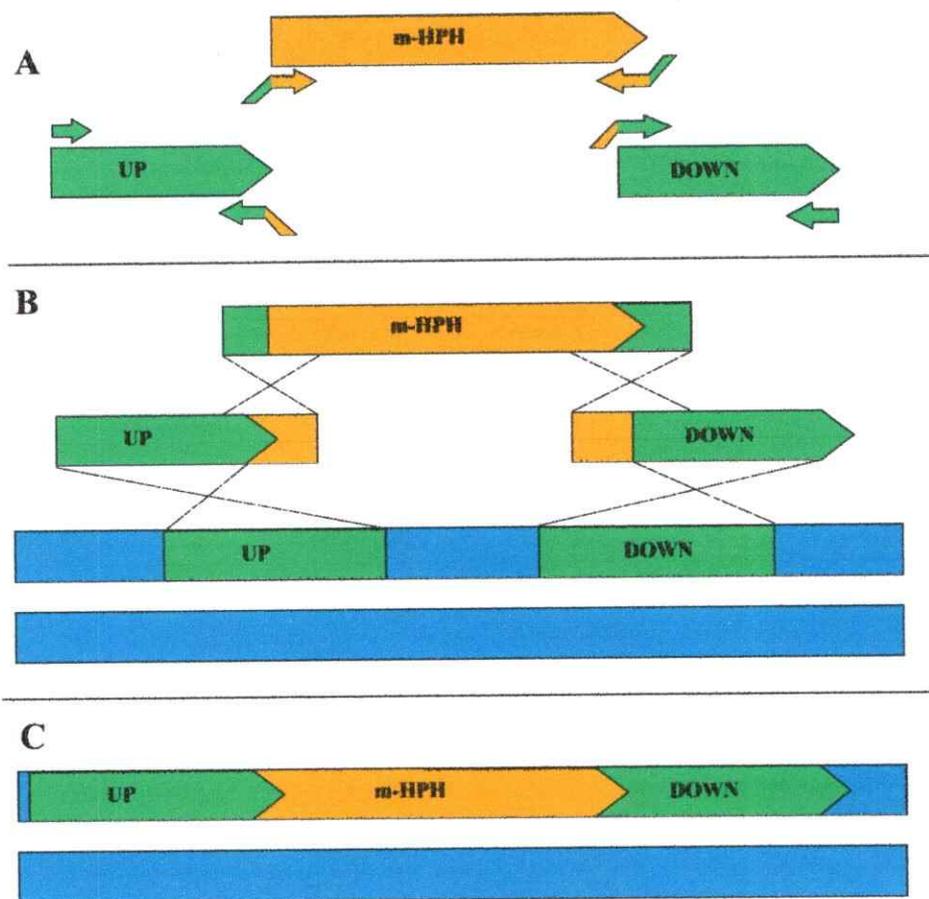


Figura 17.- Esquema representativo de las etapas para la transformación de la cepa de *S. cerevisiae* resistente al antibiótico higromicina B. De color verde se observan los segmentos de DNA (*up* y *down*) usados para dirigir la integración del módulo en el cromosoma de la levadura, de color anaranjado se observa el módulo de resistencia a higromicina B, m-HPH y en azul se observa el cromosoma blanco de la inserción de la levadura. Se distingue en el diagrama una segunda copia del cromosoma de la levadura, sin embargo, no se conoce cuantas copias se encuentran en la cepa empleada Ethanol Red™. Etapas: A) Reacción de PCR inicial para amplificar los fragmentos que serán utilizados para la transformación, esta reacción empleó partidores que llevan regiones de homología al DNA que se quiere unir. Los oligonucleótidos se representan por una flecha del color del segmento de DNA que amplifican, B) Se observan los eventos de recombinación homóloga *in vivo* que ocurrirían durante la transformación. Los fragmentos de DNA amplificados anteriormente son co-transformados en *Saccharomyces cerevisiae* donde ocurren los eventos de recombinación (líneas punteadas entre segmentos homólogos y con uno de los cromosomas de la levadura), C) Se observa el resultado esperado de la transformación como un ensamblaje total de los fragmentos insertos en el cromosoma de la levadura.

Una vez amplificados los fragmentos de DNA, se tomaron aproximadamente 250 ng de los fragmentos *up* y *down*, y 350 ng del módulo de resistencia a higromicina B, los que fueron precipitados en etanol al mismo tiempo y en el mismo tubo. Con esta mezcla de DNA, se transformaron células electrocompetentes de la cepa Ethanol Red™ de *S. cerevisiae* y se seleccionaron las células transformadas en placas YM suplementadas con higromicina B a 100 mg/ml para la cepa Ethanol Red™ y a 70 mg/ml para la cepa S288c. De esta manera se obtuvo 3 clones transformantes resistentes al antibiótico, a los que se les extrajo DNA cromosómico.

La integración del módulo m-HPH en el sector de interés esperado inicialmente se evaluó por PCR estándar sobre DNA genómico en los tres clones (Figura 18).

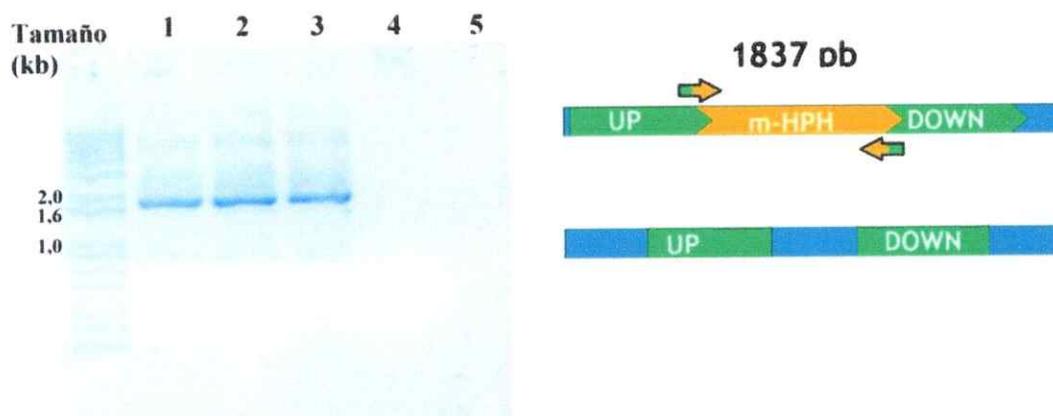


Figura 18- Resultados de PCR para clones transformados con módulo de resistencia a higromicina B. Amplicones obtenidos desde cepas transformantes resistentes a higromicina B (*SchphRS* 1, 2, 3), se indican como 1, 2 y 3 sobre el carril respectivo. El carril 4 corresponde a la cepa de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ silvestre y en el carril 5 al control negativo (sin DNA). Se amplificó el módulo completo utilizando los partidores cHPH-f y cHPH-r (1) que contienen colas de homología con las regiones *up* y *down* respectivamente. A la derecha se presenta un esquema de las regiones amplificadas en los clones resistentes y la ausencia del módulo en la cepa silvestre no arroja amplificadas luego de la reacción de PCR.

Como se puede observar en esta Figura, los tres clones fenotípicamente positivos amplifican para el módulo m-HPH mostrando una banda de aproximadamente 1,8 kb (partidores cHPH-f y cHPH-r). Se puede decir entonces que al resultar positivas al PCR empleando partidores que tienen regiones de homología con los segmentos *up* y *down* presentan el módulo de resistencia en sus genomas. Esto se puede comprobar además por la ausencia de banda en la cepa silvestre de *S. cerevisiae* Ethanol Red™. Sin embargo, mayores análisis que permitan deducir la correcta inserción en el sitio de interés y el orden de integración, son necesarios. De las tres colonias obtenidas se eligió el clon número 1 al que se le llamó ShphRSc, cepa de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ resistente a higromicina (Figura 19).

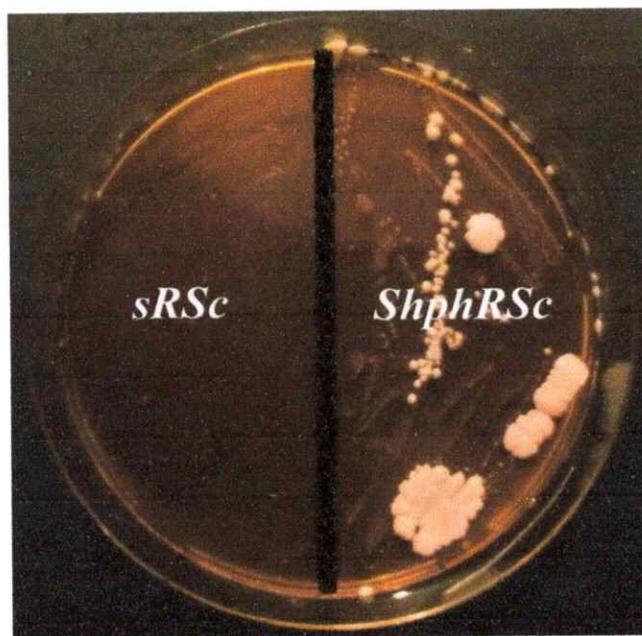


Figura 19.-. Fotografía comparativa entre las cepas sRSc (*S. cerevisiae* Ethanol Red™ silvestre) y la cepa resistente a higromicina B, ShphRSc 1. Cultivo YPM sólido suplementado con higromicina B a 100 µg/ml.

3.4.2 Obtención de cepa productora de bioetanol a partir de manitol.

Dada la alta controversia existente en la literatura respecto a la capacidad intrínseca de *S. cerevisiae* de catabolizar el manitol, fue necesario evaluar en primera instancia la capacidad metabólica propia en presencia de este poliol de ambas cepas silvestres utilizadas durante esta investigación, a saber, S288c y Ethanol Red™. Primeramente, se estudió la capacidad de crecer en cultivos con medios ricos en manitol. De estos ensayos preliminares se observó que ninguna de las cepas fue capaz de crecer en medio YPM y SM (que llevan manitol en reemplazo de glucosa). Posteriormente, se realizaron cultivos aeróbicos y anaeróbicos de ambas cepas, teniendo como control los respectivos cultivos en medio YPD y SC que llevan glucosa. Estos cultivos fueron dejados a 30° y a 200 rpm por un total de 21 días para ver si ocurría algún evento de adaptación tal como documentó Quain y colaboradores (1987). No obstante, estos experimentos también arrojaron resultados negativos tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (datos no mostrados). Por lo tanto, se propuso transformar la cepa de *S. cerevisiae* etanol Ethanol Red™ por integración genómica estable de los genes YNR073c (MDH) y *hph* en la región YPRC τ 3. Para ello, se transformó esta cepa de levadura mediante el método de *DNA assembler* con los respectivos módulos de expresión m-HPH y m-MDH en este sitio de integración. El procedimiento para dicha transformación y el orden esperado se esquematiza en la Figura 20. Sin embargo sólo se mencionarán los resultados obtenidos para la cepa industrial Ethanol Red™. A partir de esta transformación se obtuvieron 3 colonias transformantes resistentes al antibiótico higromicina B crecidas en medio YPD sólido suministrado con 100 mg/ml de este antibiótico, y se les denominó sMDHc 1, 2 y 3 respectivamente.

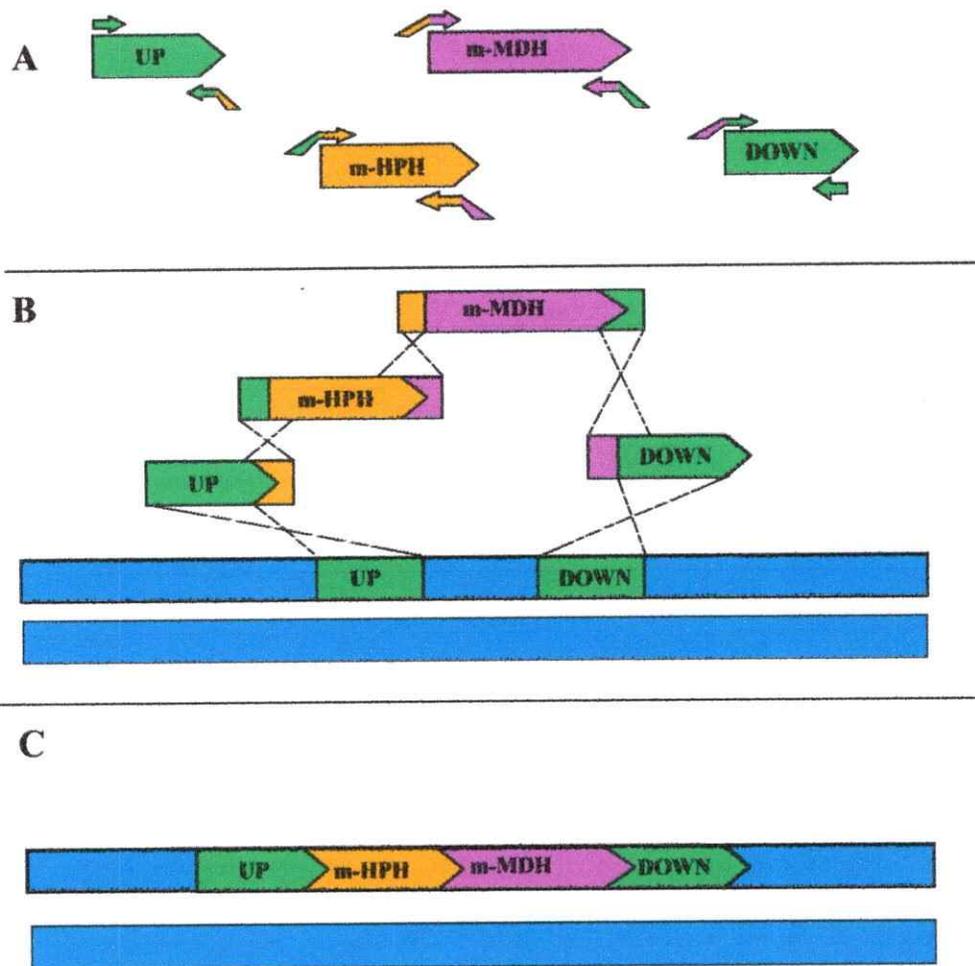


Figura 20.- Esquema del orden de inserción de módulos para la transformación de *S. cerevisiae* productora de etanol a partir de manitol. En verde se muestran los segmentos de DNA (*up* y *down*) usados para dirigir la integración de los módulos en el cromosoma de la levadura (sitio de integración de color azul). En color amarillo se observa el módulo m-HPH de resistencia a higromicina B y en morado el módulo m-MDH que lleva el gen YNR073c que codifica para una putativa manitol deshidrogenasa. En la representación se observa un segundo cromosoma de color azul sólo a modo de ejemplo ya que no se conoce la ploidía de la levadura industrial. **A)** Amplificado por PCR de módulos para la transformación utilizando partidores que incluyen una región homóloga al fragmento con que se quiere unir. Los partidores se representan por flechas del color del DNA que amplifican más una del color del fragmento con que se quiere ensamblar. **B)** Eventos de recombinación homóloga entre los fragmentos y con el cromosoma de la levadura en el sitio de inserción. Los fragmentos amplificados previamente son co-transformados en *S. cerevisiae* Ethanol Red™ donde ocurre recombinación homóloga *in-vivo*, indicado por líneas punteadas, entre segmentos homólogos y el cromosoma de la levadura. **C)** Resultado final del ensamblaje de fragmentos en el cromosoma de la levadura mostrando el orden esperado.

Como una primera aproximación funcional se evaluó la capacidad de crecer en medio YPM y SM de las tres colonias obtenidas, observándose que las colonias sMDHc 1 y 2 crecieron en medios de cultivo que llevaban manitol (YPM y SM) en lugar de glucosa solamente en cultivos aeróbicos, mientras que la colonia sMDHc 3 no fue capaz de crecer ni en presencia ni en ausencia de oxígeno (Cultivos a saturación se observan en la Figura 21 A). Esto se corroboró midiendo DO de los cultivos en el tiempo (datos no mostrados). Posteriormente, se extrajo DNA genómico de las tres cepas transformantes, el que se analizó por PCR para confirmar la integración de los módulos amplificando la región de inserción, empleando los partidores UP-f y DOWN-r. A partir de los amplificados esperados obtenidos se observa que en las cepas sMDHc 1 y 2 se amplificó un fragmento de DNA cercano a 5 kpb que no corresponde a la suma de los módulos m-HPH y m-MDH más los segmentos *up* y *down* (tamaño esperado 5,6 kpb). Además, en ambas cepas, se observó una segunda banda cercana a 4 kpb. Estos tamaños podrían haber sido determinados con mayor exactitud en un gel de mayor tamaño y/o de menor porcentaje de agarosa corrido por más tiempo. No obstante, estos resultados estarían indicando que la cepa industrial Ethanol Red™ es aneuploide por lo que no se conoce bien su número exacto de cromosomas. Por su parte, el clon sMDHc 3, incapaz de crecer en manitol, presentó una banda para el sitio de inserción de menor tamaño al esperado de aproximadamente unos 2,3 kbp, por lo que se descartó continuar con su evaluación (Figura 21 B). Dado estos resultados, se realizó una segunda evaluación por PCR de los clones sMDHc 1 y sMDHc 2 empleando partidores intermedios que permitieran ver la presencia de los módulos en los clones obtenidos (Figura 22). En estos se observó que

ambas cepas contienen los módulos insertados. Sin embargo, no se evaluó el orden de la inserción empleando partidores intermedios, por lo que mayores estudios son necesarios.

A



B

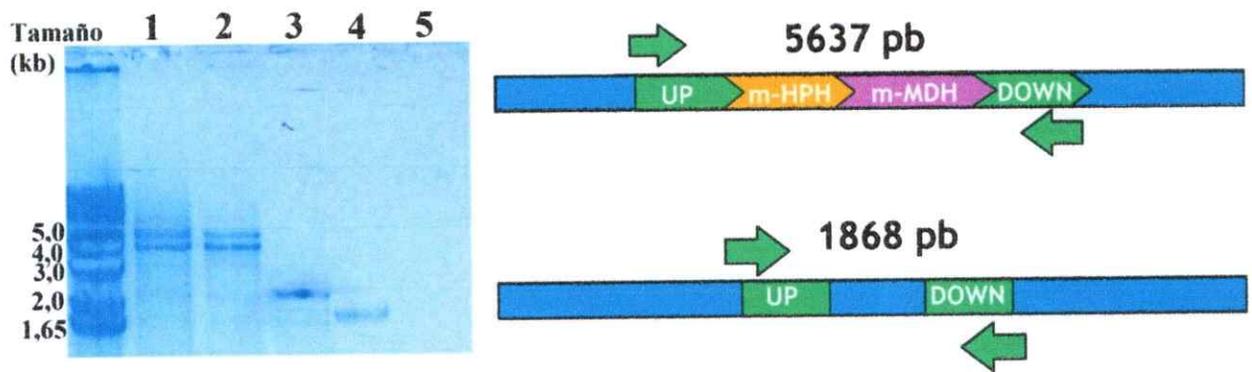


Figura 21.- Evaluación por PCR de los clones obtenidos para la transformación Manitol deshidrogenasa. A) Fotografía de cuatro cultivos aeróbicos a saturación de las cepas sMDHc 1, 2 y 3, y la cepa control Ethanol Red™ crecidas en medio YPM a 30° C y 200 rpm luego de una noche de cultivo. Se observa que sólo las cepas sMDHc 1 y 2 lograron utilizar el manitol como fuente de carbono y energía (turbidez de los cultivos), mientras que ni la cepa Ethanol Red™ silvestre ni el clon sMDHc 3 pudieron utilizar el polialcohol como fuente de carbono. B) Resultados de PCR de DNA genómico de las cepas sMDHc 1, 2 y 3 empleando los partidores UP-f y DOWN-r. Carriles: 1) Cepa sMDHc 1. Se observa la presencia de dos bandas una cercana a 5 kbp y otra cercana a 4 kbp 2) Cepa sMDHc 2. Se observa la presencia de dos bandas cercana a 5 kbp y otra cercana a 4 kbp, 3) Cepa sMDHc 3, se observa una banda de aproximadamente 2,3 kpb, 4) Cepa control Ethanol Red™. Se observa una banda de 1,8 kpb correspondiente al sitio de inserción sin transformar. A la derecha se observa un esquema representativo de los amplificados esperados. Como marcador se utilizó 1 kbp plus.

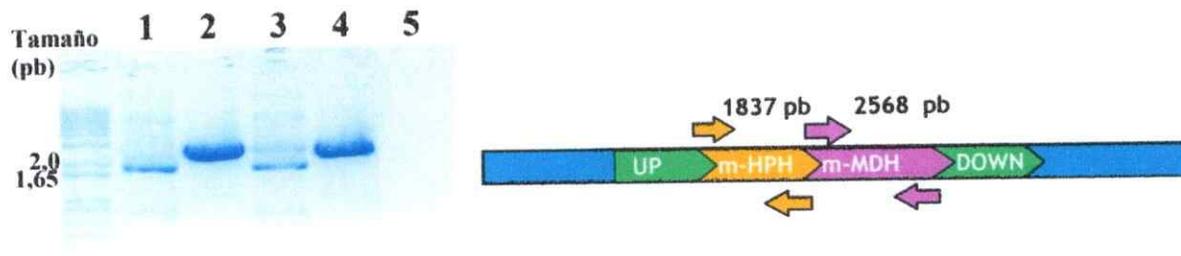
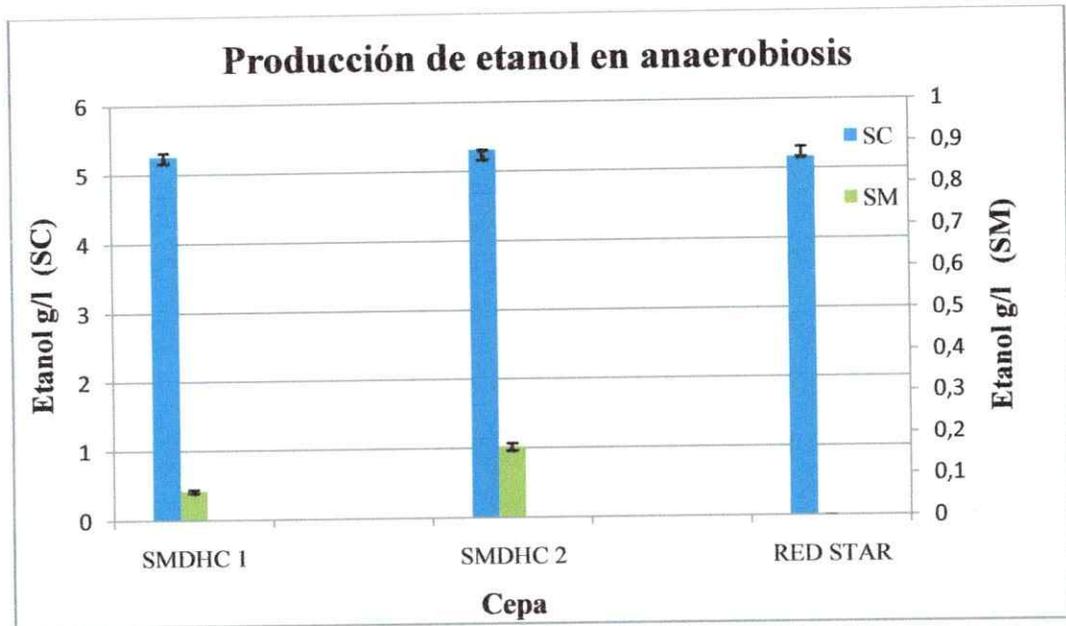


Figura 22.- Resultados de PCR para comprobar la presencia de ambos módulos en las cepas sMDHc 1 y 2. Carriles 1 y 2 corresponden a la cepa sMDHc 1, se puede observar que amplifica para ambos módulos (Carril 1 mHPH 1837 pb y Carril 2 m-MDH de 2568 pb). Carriles 3 y 4 corresponden a la cepa sMDHc 2, que también amplifica para ambos módulos (Carril 3 mHPH 1837 pb y Carril 4 m-MDH de 2568 pb). Carril 5 corresponde a la cepa control S288c, que no amplifica para el módulo m-MDH.

3.4.2.1 Curva de producción de Etanol y Cromatografía de gases.

Para evaluar la producción de etanol de las cepas sMDHc 1 y sMDHc 2, capaces de crecer en los medios YPM y SM en condiciones aeróbicas, se procedió a evaluar la producción de etanol de éstas midiendo este metabolito con el cromatógrafo de gases. Para ello se realizó una curva de calibración con soluciones de etanol de 10 g/l, 5 g/l, 2 g/l, 1 g/l y 0,5 g/l. Con estas soluciones se generó una relación matemática interna que permite obtener resultados directos de la concentración de etanol en muestras que se encuentren dentro de los límites establecidos.

A



B

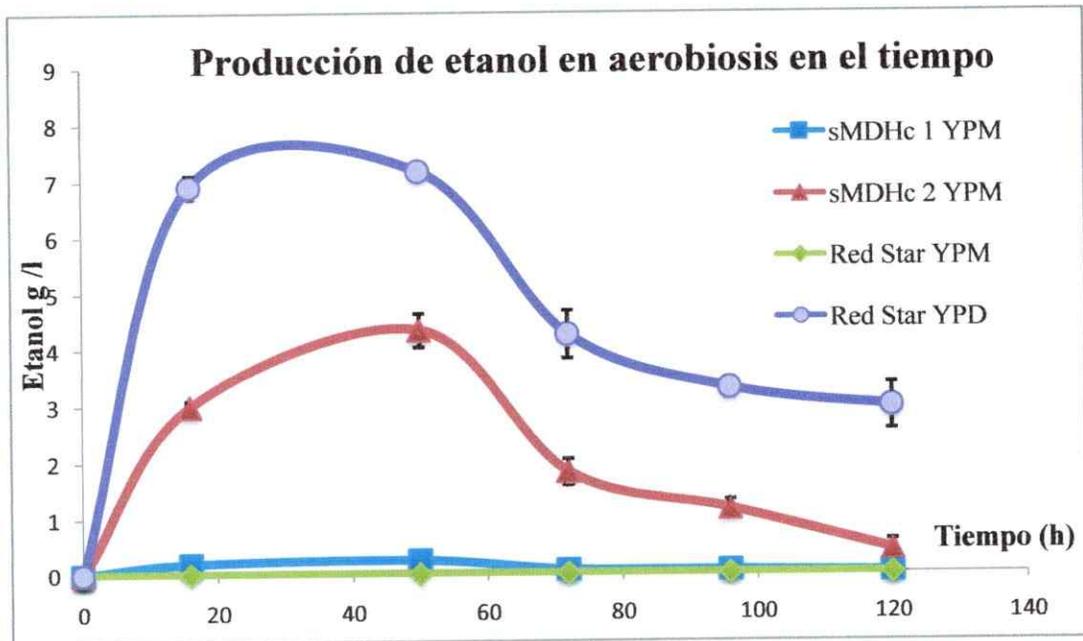


Figura 23.- Gráfico de producción de etanol en anaerobiosis y aerobiosis de cepas sMDHc 1 y sMDHc2. A) Ensayo de producción de etanol en condiciones anaeróbicas en medio mínimo, mediciones al tercer día en el cromatógrafo de gases, se observa que las tres cepas producen alrededor de 5,2 g/l en medio mínimo glucosa (SC) y sólo las cepas SMDHc 1 y SMDHc 2 producen etanol en medio mínimo manitol (SM). B) Curva de producción de etanol en condiciones aeróbicas. En morado se observa la producción de etanol de la cepa control Ethanol Red™ en medio YPD, en color azul se observa la producción de etanol de la cepa sMDHc 1 en medio YPM, que alcanza a producir 0,25 g/l a las 50 horas, mientras que en rojo se observa la producción de etanol de la cepa sMDHc 2 en medio YPM que produce 4,34 g/l al mismo tiempo. En verde se observa la cepa Ethanol Red™ silvestre en medio YPM, incapaz de producir etanol. Las gráficas muestran el promedio de tres muestras biológicas más su desviación estándar.

Los medios SC y SM son medios sintéticos que contienen respectivamente 20 g/l de glucosa y 20 g/l de manitol como fuente de carbono. Para evaluar la capacidad de producir etanol de ambos clones obtenidos, inicialmente se midió la producción de etanol en medio SM líquido y en SC líquido en tubos de 1 ml sin agitación luego de tres días de incubación. Los resultados se muestran en la Figura 23 A, donde ambas cepas produjeron alrededor de 5,5 g/l de etanol en medio SC (sin cambios significativos respecto a la cepa Ethanol Red™ silvestre) y valores de etanol cerca del límite de detección en medio SM. Esto indicaría que la producción de etanol estaría limitada en condiciones de anaerobiosis.

Adicionalmente, se estudió en ensayos de matraz la capacidad de ambas cepas para producir etanol en aerobiosis en medio YPM. Para ello, se realizaron por triplicado cultivos de cada clon y se incubaron a 30 °C y 95 rpm de agitación para asegurar un nivel intermedio de aireación. Se monitoreó la producción de etanol en el cromatógrafo de gases a las 16, 50, 72, 96 y 120 horas, observándose que la cepa SMDHc 2 fue capaz de producir concentraciones significativas de etanol, alcanzando un *peak* de ~ 4,34 g/l de etanol. Estos resultados se observan con mayor detalle en la Figura 23 B.

3.4.3 Sistema de transformación para cepa portadora de los genes MDH y noxE, y otras cepas.

Para evaluar el crecimiento y la producción de etanol en condiciones anaeróbicas empleando el manitol, se construyó el módulo m-NoxE, que junto a los módulos m-MDH, de resistencia a higromicina B y los fragmentos *up* y *down* permitirían la transformación de una tercera cepa portadora de los genes *hph*, MDH y *noxE*. Siguiendo

el sistema de transformación probado en la cepa Ethanol Red™, los partidores y plásmidos para la amplificación de cada módulo se indican en la Tabla 7. De este modo queda programado el modelo a seguir para futuras transformaciones que faciliten la obtención y evaluación de una cepa productora de bioetanol desde manitol en condiciones de anaerobiosis.

De igual modo, queda abierta la posibilidad de transformar cepas que utilicen todos los otros módulos de expresión creados en esta tesis y que surjan a merced de sus resultados.

4. DISCUSION

4.1 Levantamiento y clonamiento de genes.

En el presente trabajo se planteó como primer objetivo específico el levantamiento y clonamiento de genes evaluados *a priori* como necesarios para estudiar el metabolismo del manitol en *S. cerevisiae*, con el fin de obtener una cepa capaz de crecer en este poliol y fermentarlo hasta etanol.

4.1.1 Amplificación y clonamiento de genes de *Saccharomyces cerevisiae* S288c.

Los genes de la cepa *S. cerevisiae* estándar de laboratorio S288c: YNR073c (que codifica para una putativa manitol deshidrogenasa), ADH1 y PDC1 fueron amplificados por PCR de alta fidelidad y posteriormente clonados en el vector pBluescript SK II (+). Para ello se debió extraer DNA genómico de la levadura el cual resultó ser bastante sencillo y fácil de abordar siguiendo las indicaciones del fabricante. Por otro lado, la técnica de PCR con la enzima KOD Hot Start DNA polimerasa es bastante sencilla, reproducible y de fácil estandarización. De igual forma, el posterior clonamiento en el vector pBS previamente linearizado con la enzima EcoR-V, resultó ser muy expedito. Por lo tanto, el levantamiento de genes de interés presentes en la cepa S288c resultó ser una tarea relativamente simple. No obstante, es importante indicar que la amplificación y posterior ligación en vectores de clonamiento de estos genes significó una primera etapa fundamental previo a la construcción de módulos de expresión que los contuvieran. Esto es porque es mucho más sencillo amplificar fragmentos de DNA empleando partidores con "colitas" de homología desde un plásmido que desde DNA genómico ya que ocurre menor unión inespecífica de los partidores en el DNA templado

y menor grado de interacción entre el plásmido y la estructura secundaria que adoptan los partidores.

4.1.2 Amplificado y clonamiento del gen *noxE* de *L. lactis*.

Se propuso amplificar el gen *noxE* de *L. lactis* que codifica para una NADH oxidasa citosólica con el fin de evaluar su efectividad como regulador del desbalance óxido-reducción que se produce durante el metabolismo del manitol en *S. cerevisiae* en condiciones anaeróbicas. Este gen ya ha sido estudiado, amplificado, clonado y expresado en levadura con la finalidad de suscitar un microciclo regulador del exceso de poder reductor NADH (Zhang y col., 2012). En este trabajo, el ORF de este gen fue amplificado mediante PCR de alta fidelidad, purificado desde geles de agarosa y clonado en el vector pBS. Para ello, fue imprescindible purificar DNA genómico de *L. lactis* para ser utilizado como templado.

Debido a la incapacidad inicial de crecer este microorganismo en medio LB, y a la baja cantidad de DNA en buenas condiciones que se obtuvo desde los residuos del liofilizado, fue necesario probar un nuevo medio de cultivo. De este modo, el medio de cultivo utilizado que contemplaba leche y jugo de tomate natural filtrado y autoclavado, fue apropiado para obtener un número de células óptimo que asegurase la obtención de DNA de calidad. De lo anterior, se entiende que el kit de extracción utilizado en este proceso, a pesar de ser sencillo y de fácil aplicación, no permite extraer DNA íntegro desde un bajo número de células y/o de productos liofilizados.

4.2 Síntesis de cDNA del gen que codifica para un putativo transportador de polioles de *Verticillium albo-atrum*.

Durante la evaluación de genes candidatos para ser sobre-expresados en la levadura productora de bioetanol a partir de manitol, se terminó por escoger el gen VDBG_02539 que codifica para un putativo transportador de polioles del tipo MFS. Este gen se encuentra en el hongo *Verticillium albo-atrum*, muy cercano evolutivamente a *S. cerevisiae* al pertenecer a la misma división: Ascomycota. Este gen presenta 5 exones, los que juntos llevan a la expresión del cDNA. Debido a lo costoso que resulta la síntesis génica artificial del cDNA y la dificultad de inducir su expresión para obtener el cDNA desde RT-PCR, se propuso su construcción mediante la técnica de PCR recursivo y PCR de extensión a partir de DNA genómico de *V. albo-atrum*. Para llevar a efecto esta construcción se diseñaron los partidores que permitirían obtener un fragmento de 119 pb correspondientes a la fusión de los exones 1 y 2 mediante PCR recursivo, así como de los oligonucleótidos necesarios para amplificar e hibridar los demás exones.

A partir de estos estudios se pudo experimentar que la técnica del PCR recursivo es una estrategia sencilla y de rápida estandarización que permite construir fragmentos de DNA haciendo solamente uso de partidores. Por otro lado, la técnica de OE-PCR empleando la técnica de KOD Hot Start polimerasa fue efectiva en lo que respecta a la unión del fragmento inicial de 119 pb con los demás exones.

De este trabajo se obtuvo el cDNA completo y ligado al vector pBS, sin embargo, no se construyó el módulo de expresión que lo contuviera y tampoco se evaluó su expresión en *S. cerevisiae*.

4.3 Construcción de módulos de expresión en *S. cerevisiae*.

En este trabajo se construyeron diferentes módulos individuales de expresión en *S. cerevisiae* de diferentes genes que llevan a la producción de etanol a partir de manitol, así como de un gen que otorga resistencia al antibiótico higromicina B. En lo particular, se armaron módulos de los genes *hph* presente en el vector pcDNA, del gen *noxE* de *L. lactis* y de los genes de la cepa de levadura S288c YNR073c, que codifica para una manitol deshidrogenasa putativa, ADH1, que codifica para una alcohol deshidrogenasa y PDC1, que codifica para una piruvato decarboxilasa. Para esto se amplificó cada componente por separado, a saber, promotor, ORF del gen, y terminador los que luego fueron hibridados empleando la técnica de OE-PCR. Los módulos fueron clonados en el vector pBluescript-SK II (+) y transformados en *E. coli* DH5- α .

El proceso de construcción de los módulos no fue un proceso sencillo, dado que se tuvo que estandarizar la técnica empleando la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad KOD Hot Start, diferente a la *pfu* polimerasa utilizada en estudios anteriores (Werner, 2012). No obstante las dificultades, fue posible diseñar un protocolo reproducible que permitiera finalmente obtener los módulos de expresión de manera rápida y eficiente. Por otro lado, la obtención de diferentes módulos de expresión en este trabajo, algunos de los cuales no fueron utilizados para transformar las levaduras, abre la posibilidad de realizar diversos experimentos de transformación a futuro, ya sea combinando diferentes módulos de expresión y comparando los resultados obtenidos en secuencia. Esta es una de las ventajas más relevantes de la técnica de DNA *assembler*, ya que una vez construidos y clonados los módulos de expresión, estos pueden ser

utilizados en un sinnúmero de posibles combinatorias. Ello se logra sólo modificando la secuencia de los partidores empleados para amplificar cada módulo desde el plásmido que lo contiene, previo a la transformación, obteniéndose así módulos con regiones de homología que permitan nuevas modificaciones.

En este trabajo en específico, se construyeron más módulos de los utilizados a razón de obtener cepas de manera secuencial que vayan portando cada vez un número mayor de genes para su evaluación. De esta forma se espera obtener la mejor combinación de genes en lo que respecta a la producción de etanol empleando el manitol como única fuente de carbono y energía. En primer lugar, se puede evaluar con esta técnica el efecto que ejerce, por ejemplo, la expresión del gen *noxE* en la producción de etanol en condiciones anaeróbicas, así como la importancia de contar con un gen que codifique para un transportador de polioles como el sintetizado en este trabajo. De este modo, y una vez obtenidas las cepas por separado, se pueden diseñar experimentos que permitan dilucidar cuál de todas ellas es la más propicia para la producción de bioetanol a escala industrial. Del mismo modo, los módulos ADH1 y PDC1, pueden servir como potenciales estrategias optimizadoras durante la fermentación alcohólica.

Otra de las ventajas de este método de transformación es que permite la inserción de múltiples genes a la vez, lo que incluso posibilitaría incorporar más de una vía, empleando un segundo marcador de selección (Ej. Kan). Por ejemplo, se pueden diseñar módulos de expresión para los genes implicados en la vía de degradación del alginato e integrarlos todos en otra potencial región de inserción en *S. cerevisiae*. Uno de estos sitios podría ser el sitio N° 20 caracterizado por Bai Flagfeldt y colaboradores en 2009

que también presenta altos índices de expresión en la cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK113-5D.

Durante la realización de este trabajo de investigación se realizaron estudios de comparación generales entre la técnica OE-PCR y ensamble enzimático de Gibson (datos no mostrados) (Gibson y col., 2009). Esta última metodología permite el ensamble de moléculas de DNA de diferente origen hasta alcanzar más de 100 kpb. Para ello, se someten los fragmentos a enlazar a una reacción enzimática isotérmica en la que participan tres enzimas cruciales: una exonucleasa, que permite degradar una de las hebras de DNA liberando grandes extremos cohesivos, una polimerasa de alta fidelidad, que completa los segmentos incompletos una vez hibridadas las moléculas a enlazar, y una taq ligasa, que permite ligar las moléculas de DNA a altas temperaturas. Si bien esta técnica resultó ser más sencilla en cuanto a su estandarización, es más costosa y no justifica la utilización de las enzimas para la construcción de módulos de expresión de no más de 3 kpb que una vez estandarizada la técnica pueden ser fácilmente ensamblados por PCR de extensión. Por esta razón se prefirió continuar empleando esta última estrategia. Sin embargo, dada las ventajas que aporta la técnica de Gibson, esta podría ser utilizada en la construcción de fragmentos de DNA de mayor tamaño, como la fusión ordenada *in vitro* de los módulos de expresión contruidos facilitando eventos de recombinación homóloga *in vivo* a la levadura cuando se intenten insertar vías metabólicas de gran tamaño, aumentando la eficiencia del método.

La elección de promotores y terminadores se realizó teniendo en cuenta que éstos ya hayan sido ocupados con éxito en *S. cerevisiae* para expresar otros genes implicados

en vías metabólicas exógenas diferentes a la levadura y por pertenecer a genes activos durante la glicólisis. Por esta razón, se evaluó en primer término las secuencias utilizadas por Shao y Zhao (2009), quienes lograron transformar *S. cerevisiae* con módulos de expresión de genes que llevaron a la obtención de rutas metabólicas funcionales para la expresión de diversos genes relacionados con el metabolismo de la xilosa y la síntesis de zeaxantina. De igual modo, se estudió el uso de promotores y terminadores empleados por Werner (2012) en su estudio para la producción de carotenoides en levadura. Finalmente, durante la fase de diseño de partidores en esta tesis se tuvo crucial cuidado en no utilizar promotores y terminadores pertenecientes a un mismo gen para la construcción de un módulo con el fin de evitar una posible recombinación homóloga entre el módulo y el gen endógeno de *S. cerevisiae* portador de estas secuencias funcionales.

Para finalizar, se notó que la para la confección de los módulos de expresión, la etapa más relevante es el diseño y confección *a priori* de los partidores con sus respectivas secuencias de homología. Esta etapa es crucial para garantizar el éxito en la construcción final de los módulos.

4.4 Transformación de *S. cerevisiae*.

4.4.1 Cepa resistente al antibiótico higromicina B.

Un importante desafío de este trabajo de tesis fue lograr transformar la cepa industrial de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ mediante la integración genómica estable de los módulos de expresión en el sitio cromosómico escogido.

Inicialmente fue bastante complejo amplificar desde los vectores de clonamiento que contenían los fragmentos ya que los partidores empleados para su amplificación tenían “colas” de alrededor de 25 pb que no hibridaban directamente con el DNA, y que eventualmente formaban estructura secundaria, impidiendo un normal curso de la reacción de PCR. Por esa razón, fue necesario evaluar bien la temperatura de alineamiento de los partidores y/o utilizar un partidador con cola de hibridación y otro que no la llevase. No obstante lo anterior, este problema inicial fue rápidamente solucionado teniendo en consideración lo mencionado anteriormente.

La obtención de colonias transformantes resistentes a altas concentraciones del antibiótico (en contraste con la cepa silvestre) y su análisis por PCR permitió confirmar que esta tecnología es efectiva en esta cepa industrial de *S. cerevisiae*. No obstante la obtención de sólo tres colonias positivas luego de 2 días de incubación se puede considerar como un bajo rendimiento en comparación a lo documentado por Shao y Zhao (2009), quienes obtuvieron entre 100-150 colonias al insertar tres módulos en la cepa de *S. cerevisiae* de laboratorio YS650.

En este trabajo se obtuvieron tres clones recombinantes que contenían el módulo de resistencia a higromicina B puesto que los partidores empleados amplifican el módulo y una parte de los segmentos *up* y *down*. No obstante lo anterior, estos ensayos de verificación no fueron suficientes habiendo sido ideal un diseño de partidores que permitiera amplificar segmentos intermedios entre el módulo y el sitio de inserción que ayudaran a deducir que el módulo m-HPH fue insertado en el sitio correcto. Adicionalmente, tampoco se evaluó por PCR el tamaño del sitio de inserción utilizando

partidores que amplificaran la región completa desde el segmento *up* hasta el segmento *down*. Al analizar el sitio YPR τ 3, que corresponde al sitio de integración, se podría haber hecho un acercamiento a las condiciones genéticas de la levadura y una aproximación más certera del número de cromosomas que esta posee. Esto es particularmente importante ya que cuando se comparan las levaduras empleadas en el laboratorio con las utilizadas en la industria, se encuentran relevantes distinciones desde el punto de vista genético. La mayoría de las cepas empleadas en el laboratorio son cepas haploides o diploides homocigotas a las que se les ha mutado el locus HO (haciendo imposible la ocurrencia de eventos *mating*), por lo que son altamente estables (Salmon, 1997), mientras que las cepas industriales (como la Ethanol Red™) suelen ser diploides, aneuploides o incluso poliploides (Bradbury y col., 2006). Estas últimas, muestran un alto índice de polimorfismo en la longitud de los cromosomas (Bidenne y col., 1992; Rachidi y col., 2000) lo que explica la alta diversidad que existe en algunas de las características industriales, tales como la eficiencia en la fermentación, permitiéndoles adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Salmon, 1997).

Uno de los aspectos que no se evaluó en el desarrollo de esta tesis y que significa una alternativa interesante, fue incluir secuencias repetidas directas en el diseño experimental de transformación con la finalidad de escindir el cassette de resistencia a antibiótico por recombinación, una vez que se ha obtenido la cepa de levadura modificada (Rothstein, 1991; Längle-Rouault & Jacobs 1995). Esta estrategia fue probada por Werner (2012) para la producción de carotenoides donde se logró escindir completamente el módulo de resistencia a higromicina B, dejando una secuencia del

repetido directo como “cicatriz” en el sitio de integración. Este es un importante aspecto que se debe evaluar en futuros experimentos, dado que, al utilizarse una cepa de levadura con aplicación industrial destinada a la producción de etanol a partir de manitol en reactores de gran tamaño, se evitaría el uso de antibióticos a fin de mantener la presión selectiva, abaratando enormemente el proceso fermentativo. Por otro lado, no es recomendable utilizar microorganismos que porten genes de resistencia a antibióticos en procesos industriales por el riesgo que significa su traspaso a cepas de microorganismos del ambiente (Pruden y col., 2006). Adicionalmente, y una vez que el módulo de resistencia se ha eliminado, la presencia de la “cicatriz” podría ser utilizada como un marcador molecular distintivo de la cepa de levadura producida, ya sea para monitorear contaminaciones durante el proceso o en casos en los cuales la levadura fuera utilizada sin la correcta autorización de sus propietarios (Werner, 2012).

4.4.2 Obtención de cepa productora de bioetanol a partir de manitol.

En este estudio, la transformación de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ con los módulos de sobre-expresión de los genes YNR073c (putativa manitol deshidrogenasa de la cepa S288c) y *hph* (resistencia a higromicina B) permitió obtener una cepa industrial capaz de asimilar el manitol como sustrato, crecer y producir bioetanol en ausencia de un gen que codificara para un transportador de membrana. Luego de la transformación y recombinación homóloga *in vivo* en la levadura, se obtuvieron tres colonias aisladas resistentes al antibiótico higromicina B a las que se les llamó cepa sMDHc 1, sMDHc 2 y sMDHc 3. La obtención de tres clones también significa un rendimiento menor a lo

documentado por Shao y Zhao (2009) para la integración de tres módulos de expresión. Por otro lado, la obtención de tres colonias, al igual que para la inserción de un módulo, indicaría que la eficiencia en la transformación para la cepa Ethanol Red™ no difiere al integrar uno o dos módulos.

La funcionalidad de los módulos de expresión y el éxito de la transformación pudo corroborarse inicialmente por la obtención de dos clones (sMDHc 1 y sMDHc 2) capaces de crecer en medio mínimo manitol (SM), en el que la cepa silvestre de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ estudiada aquí, no crece. Con esto se puede inferir indirectamente que el gen YNR073c codificaría para una manitol deshidrogenasa activa, no obstante, sería apropiado evaluar su expresión a nivel de RNAm y proteína.

Al analizar por PCR el amplificado para el *locus* YPRC τ 3, que corresponde al sitio de integración, se observó que en ambos clones se amplificaron dos bandas cercanas a 5 kpb y a 4 kpb, lo que no se condice con el tamaño esperado para todo el constructo (desde segmento *up* hasta *down*) de aproximadamente 5,6 kpb. Por otro lado, la cepa sMDHc 3 (que no crece en manitol) amplificó una banda de 2,3 kpb, en contraste con el tamaño obtenido en la cepa silvestre de 1,8 kpb que coincide con el sitio de inserción sin integración exógena (control).

Si bien, para las cepas que sí fueron capaces de crecer se obtuvo una banda muy cercana al tamaño esperado, se observa otra banda de menor tamaño que indicaría algún evento de inserción incompleto o de posteriores deleciones parciales dentro del sitio en otro lugar del genoma y/o en otro cromosoma. Para el caso de la cepa que no pudo

crecer en manitol se observa un tamaño relativamente mayor al tamaño obtenido en el control de la cepa silvestre, lo que podría indicar un fenómeno de transposición y/o escisión de la construcción luego de insertada. Debido a que esta aproximación por PCR se repitió 2 veces, obteniéndose el mismo resultado, se puede inferir que es muy probable además, que haya sido necesaria una re-evaluación de los ciclos y concentraciones empleadas en la reacción de PCR puesto que se trataba de un fragmento a amplificar de gran tamaño y es muy probable que la DNA polimerasa no haya alcanzado a abarcar todo el fragmento obteniendo fragmentos de menor tamaño (Tiempo de extensión de 1 min). Por otro lado, las limitaciones del gel en tamaño y tiempo de corrida significaron un importante impedimento al momento de determinar con precisión el tamaño de los amplicones, razón por la cual hubiera sido necesaria la realización de una electroforesis de mayor tamaño en geles a baja concentración de agarosa (0,8%).

Estos resultados podrían explicarse si existiera más de una copia de la secuencia sobre la que se produce integración genómica. Al ser el sitio de integración un transposón, podrían ocurrir eventos de transposición, perdiéndose la integración genómica realizada y/o posibles eventos de recombinación homóloga entre regiones alejadas del genoma. Esta posibilidad resulta poco probable puesto que tal como documentó Hug y Feldmann (1996), no se han observado eventos de transposición para el sitio seleccionado, el que además, se encuentra en muy bajo número de copias (de 1 a 4). Por otro lado, este sitio ya ha sido evaluado por Flagfeldt y colaboradores (2009), presentando altos niveles de expresión de genes exógenos insertados de manera estable. Al ser un sitio ya

caracterizado, exige la necesidad de realizar *a priori* estudios en cuanto a si su modificación afecta el metabolismo, fisiología y normal crecimiento de la levadura.

Por lo tanto, la respuesta más satisfactoria a la presencia de dos bandas indicaría que la levadura Ethanol Red™ empleada es diploide o aneuploide,. Esto le permitiría a *S. cerevisiae* reproducirse y adaptarse frente a la capacidad de consumir manitol seleccionando los clúster de integración que más le resulten favorables. El incremento en la dosis génica se ha realizado anteriormente empleando el método de doble recombinante (Niklitshek y col., 2008), donde cepas diploides heterocigotas de *Xanthophyllomyces dendrorhous* sometidas a altos índices de presión selectiva, favorecen la aparición de cepas homocigóticas para el marcador de selección mediante un proceso de evolución dirigida. Esta metodología también se ha realizado en cepas del mismo hongo transformadas con DNA *assembler*, logrando obtener cepas homocigotas que sobre-expresan todos los genes insertados (Contreras, 2012; Werner, 2012). Estos fenómenos de adaptación y evolución en cepas de levaduras industriales evaluadas en el laboratorio se ha documentado previamente, presentando altos índices de ocurrencia (Mortimer, 2000; Gu. y col., 2005).

Posteriormente se evaluó por PCR en ambas cepas (sMDHc 1 y sMDHc 2) la presencia de los dos módulos de expresión insertados (m-HPH y m-MDH), observándose que en ambas hubo amplificación, a diferencia de la cepa parental. Este experimento evidencia que en ambos clones ocurrió la integración genómica de los módulos de interés. No obstante, y debido a las dificultades técnicas de la amplificación completa del sitio de integración, hubiera sido de gran utilidad diseñar partidores

intermedios que permitieran verificar con mayor grado de certeza la presencia de los módulos en el orden de integración esperado en el sitio de inserción.

Por otro lado, en este trabajo se integró el gen YNR073c que codifica para una manitol 2 deshidrogenasa críptica de la cepa de laboratorio S288c, obteniéndose cepas capaces de tomar y utilizar el manitol del medio. Con estos resultados se comprueba que el manitol estaría ingresando a la célula a través de transportadores de hexosas inespecíficos y promiscuos sujetos a regulación, con gasto adicional de moléculas de ATP y/o sometidos a inhibición por diferentes tipos de azúcares (Boles & Hollenberg 1997, Özcan & Johnston 1999). Dentro de los transportadores de hexosas presentes en *S. cerevisiae*, existen varios cuya expresión a nivel de mRNA es inhibida por glucosa (HXT8-HXT7), abriendo la posibilidad de que alguno de ellos haya aumentado su nivel de expresión en las cepas capaces de crecer en manitol en ausencia de glucosa (Özcan y Johnston 1999).

Finalmente, y tal como se discutió para la obtención de una cepa de levadura Ethanol Red™ resistente a higromicina B, uno de los principales desafíos en el trabajo con cepas industriales de *S. cerevisiae* es la alta diversidad y polimorfismos a nivel cromosómico, además de que son genéticamente inestables. Estas características, si bien son positivas en cuanto a las adaptaciones evolutivas que estas cepas puedan experimentar, significan importantes dificultades a la hora de aplicar técnicas de ingeniería genética y biología molecular (Attfield & Bell 2003; Werner, 2012). No obstante, queda en manifiesto que en este trabajo fue posible modificar una cepa de levadura industrial incorporándole genes que le permitan utilizar el manitol como única

fuelle de carbono y energía, aprovechando además sus características fenotípicas y genéticas basales, tales como su tolerancia a altas concentraciones de etanol.

4.4.2.1 Curva de producción de Etanol y cromatografía de gases.

Para evaluar los clones sMDHc 1 y sMDHc 2 -capaces de crecer en manitol- se monitoreó la concentración de etanol en cultivos aeróbicos y anaeróbicos empleando el cromatógrafo de gases.

Inicialmente se evaluó la capacidad productora de etanol de ambas cepas crecidas en condiciones desprovistas de oxígeno en medio SM (Figura 23 A). Estos resultados mostraron que tanto la cepa de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ silvestre como ambas cepas modificadas producían cerca de 5 g/l en medio SC, resultados muy similares a los documentados por Ota y colaboradores (2013). Esto indicaría que la construcción integrada en ambas cepas modificadas no altera el metabolismo intrínseco de la levadura. Por otro lado, se observa que cuando estas mismas cepas eran crecidas en medio SM, la cepa silvestre no produce etanol lo que es de esperar ya que esta no puede utilizar el manitol como fuente de carbono y energía. Por su parte, ambas cepas recombinantes sMDHc 1 y sMDHc 2, producen cantidades de etanol que se encuentran cercanas al límite de detección del equipo, alcanzando valores de alrededor de 0,08 g/l y 0,16 g/l respectivamente. Estos resultados, a pesar de no ser significativos, se explicarían porque en anaerobiosis las cepas de levadura capaces de crecer en manitol pueden inicialmente fermentar el manitol hasta etanol, sólo durante un breve periodo de tiempo, determinado por la activación de la vía de síntesis del glicerol (para restituir el NADH).

La producción de glicerol genera un desbalance generalizado del metabolismo lo que finalmente detiene el proceso de crecimiento celular. Por esa razón, se puede inferir que la casi indetectable cantidad de etanol producida se generó durante las primeras horas del cultivo, antes que la levadura dejara de crecer.

Adicionalmente, se evaluó la producción de etanol en cultivos en medio YPM aeróbicos a 30 °C y 95 rpm de agitación (Figura 23 B). En estos estudios se observó que las cepas recombinantes obtenidas durante esta transformación presentaron resultados bastante disímiles; mientras la cepa sMDHc 1 no produjo más de 0,25 g/l de etanol, la cepa sMDHc 2 logró producir alrededor de 4,34 g/l a las 50 horas de cultivo. Este fenómeno de adaptación observado coincide con lo documentado por Ota y colaboradores (2013), quienes estudiaron un sinnúmero de cepas de levadura silvestres con el fin de encontrar la más propicia para consumir el manitol. De esta forma lograron aislar un clon de *Saccharomyces paradoxus* a la que denominaron NBRC 0259-3 que exhibió además un alto grado de tolerancia al etanol (50 g/l), y de producir cerca de 40 g/l de etanol en medios que contienen 100 g/l de manitol luego de 12 días de cultivo. Si realizamos una aproximación teórica matemática de la cepa sMDHc 2 obtenida en este trabajo, de haber sido ésta crecida en medios conteniendo 100 g/l de manitol, se hubieran obtenido alrededor de 21,5 g/l a las 50 horas de cultivo. Estos similares resultados permiten deducir que es muy probable que la cepa sMDHc 2 se haya adaptado durante el proceso de cultivo de modo similar a lo que ocurrió con la cepa de *Saccharomyces paradoxus* NBRC 0259-3. A pesar de que estos autores no discuten con detalle lo que podría haber sucedido en esta cepa de levadura, es muy probable que se

haya alcanzado un punto de equilibrio efectivo entre el consumo de manitol, el balance óxido-reducción del NADH, la producción de biomasa y la fermentación alcohólica. Para poder esclarecer mejor estas interrogantes hubiera sido interesante estudiar el efecto de agregar antibiótico al cultivo, donde se ha observado en estudios anteriores que su aplicación induce un aumento en la productividad debido a un incremento en la presión selectiva, donde la pérdida de los genes insertados por recombinación resultaría fatal para la levadura (Werner, 2012). No obstante, y en lo particular de este estudio, la presencia de manitol en reemplazo de glucosa en los cultivos estaría ejerciendo el mismo efecto de presión selectiva, y la levadura podría estar re-arreglando su juego cromosómico con el fin de hacerse más apta para la utilización de este poliol. Vale recordar que la cepa de levadura industrial Ethanol Red™ utilizada resultó ser diploide y/o aneuploide, lo que explicaría esta capacidad de evolución en cultivos de laboratorio. Por esta razón, es posible inferir que la cepa sMDHc 2 fue más efectiva en adaptarse que la cepa sMDHc 1. No obstante lo anterior, estudios complementarios tales como el monitoreo del consumo de manitol en el tiempo (curvas decrecientes), así como del crecimiento de la levadura hubieran sido aún más esclarecedores.

Muy recientemente, se ha publicado un estudio en el que se presenta por primera vez una estrategia de ingeniería genética para obtener una cepa de *S. cerevisiae* capaz de crecer en manitol y producir etanol a partir de éste (Enquist-Newman y col., 2014). En este estudio, se evaluó el metabolismo del manitol como modificación base a la cual sustentar las modificaciones *a posteriori* referidas al catabolismo del alginato. En lo particular, Enquist-Newman y colaboradores (2014) observaron mediante microarreglos

que tres genes aumentaban su expresión en *S. cerevisiae* durante su inducción con manitol: YNR073c/YEL070W, YEL069C y YNR072W, que codifican para dos transportadores de hexosas no caracterizados, HXT13 y HXT17 respectivamente, y el gen YNR071C que codifica para una aldosa-1-epimerasa. Posteriormente amplificaron por PCR los ORF de estos genes, los que fueron clonados en un vector de expresión del tipo CEN/ARS. Estos genes fueron expresados de pares en la cepa de *S. cerevisiae* BAL02970 con el fin de observar, comparar y lograr la mejor combinatoria. De este modo, concluyeron que la sobreexpresión conjunta del gen YNR073c, que codifica para una manitol deshidrogenasa putativa (utilizada en este trabajo) y del gen YNR072W, que codifica para el transportador de hexosas HXT17, permitió obtener una cepa capaz de producir ~10 g/l de etanol en medio que contenía 75 g/l de manitol. Haciendo la misma relación matemática de antes, vemos que la cepa SMDHc 2 obtenida en este trabajo debería producir alrededor de 16,125 g/l para las condiciones de cultivo ensayadas en esta tesis.

Estos descubrimientos coinciden con los resultados expuestos en este trabajo ya que la sobreexpresión del gen YNR073c también resultó ser fundamental para que la levadura pudiese emplear el manitol como única fuente de carbono y producir etanol a partir de esta. Por otra parte, la sobreexpresión del gen que codifica para un transportador de hexosas putativo HXT17 estaría permitiendo el ingreso de este poliol de manera inespecífica a la levadura. No obstante lo anterior, su sobreexpresión en este trabajo coincide con lo esperado para la cepa SMDHc 2, donde se plantea una adaptación

al uso de transportadores promiscuos una posible respuesta al cómo este poliol estaría entrando al citoplasma celular.

Desde el punto de vista genético, ambas cepas modificadas para consumo de manitol son bastante similares, exceptuando la estrategia de ingeniería genética utilizada y la cepa receptora de estos genes. Es muy probable que la cepa BAL 02970 corresponda a una cepa de *S. cerevisiae* de laboratorio, lo que explicaría la mayor producción de etanol teórica calculada para la cepa sMDHc 2, que corresponde a una cepa modificada a partir de la levadura industrial Ethanol Red™. Esto significaría importantes ventajas respecto a la aplicabilidad de esta última cepa en procesos fermentativos a escala industrial. Por otro lado, la estandarización y aplicación de la técnica de *DNA assembler* permite obtener cepas de interés más estables que aquellas modificadas por vectores episomales. Si bien los plásmidos del tipo CEN/ARS, son más estables de lo habitual al presentar un sitio de replicación autónomo y regiones centroméricas funcionales (Amati & Gasser 1988), éstos se siguen perdiendo poco a poco, por lo que tampoco son demasiado útiles para la expresión de genes a escala industrial (Da Silva & Srikrishnan 2012). Por esta razón, la metodología planteada en este trabajo continua siendo una importante estrategia ventajosa para obtener cepas industriales estables capaces de producir etanol. Por otro lado, el empleo de vectores episomales de cualquier tipo significa un importante obstáculo en cuanto a la cantidad de genes que se pueden incorporar a la levadura debido al tiempo necesario para fabricar los vectores, la obligación de emplear diferentes marcadores de selección y el uso engorroso de diferentes enzimas de restricción.

4.4.3 Sistema de transformación para cepa portadora de los genes MDH y noxE, y otras cepas.

En este trabajo de tesis se establecieron las construcciones para realizar futuras transformaciones en la levadura *S. cerevisiae* con el fin de estudiar más en detalle y de manera secuencial la producción de bioetanol desde manitol. Las condiciones establecidas por esta investigación se sustentan en los resultados positivos obtenidos transformando la cepa silvestre de *S. cerevisiae* Ethanol Red™, que solo porta el gen YNR073c además del gen *hph* de selección a higromicina B, sumado a las diferentes observaciones y/o discusiones establecidas aquí que permitirían la realización de mejorías para los experimentos futuros que nazcan a merced de esta tesis.

Los módulos de expresión de los genes *hph* y YNR073c demostraron ser funcionales en *S. cerevisiae*, permitiéndole a la levadura no tan sólo emplear el manitol como fuente de carbono y energía, sino que además producir etanol en condiciones aeróbicas de baja agitación (95 rpm). Con el fin de evaluar el efecto de expresión de un transportador específico de manitol, así como el de un gen que codifique para una NADH oxidasa citosólica, a fin de realizar comparaciones entre las diferentes cepas obtenidas, deberán ser integrados los módulos de expresión de estos genes de manera paulatina. Inicialmente se plantea la obtención de una cepa que porte los módulos m-HPH, m-MDH y m-NoxE. Se esperaría que esta cepa fuera capaz de crecer en manitol en condiciones microaerofilas y/o anaerobias. De igual modo, una cepa que además sobre-exprese el gen que codifica para un transportador de polioles de *V.albo atrum*, permitiría discutir su funcionalidad y qué tan relevante resulta la expresión de un

transportador específico en comparación con los transportadores de hexosas promiscuos propios de la levadura. Como último acercamiento, se postula integración de los módulos m-ADH1 y m-PDC1, que se ha documentado como genes relevantes para la optimización en la producción de bioetanol (Gutiérrez-Lomelí y col., 2008; Tokuhira, y col., 2009; Ok Yu y col., 2011).

En 2009, Shao y colaboradores documentaron que la eficiencia de transformación por medio de la técnica de DNA *assembler* depende directamente del número y tamaño de módulos de expresión que se desean insertar en un sitio determinado del genoma. Así, se observó que a mayor número de constructos a ensamblar, disminuye el número de clones positivos para dicha transformación. Esto se debe a que a medida que aumenta el número de fragmentos de DNA que la levadura debe recombinar homológamente *in vivo*, disminuye la probabilidad de que todos ellos sean ensamblados correctamente y además insertados en el sitio de interés. Esto se logró apreciar levemente durante la realización de este trabajo ya que para obtener una cepa productora de etanol desde manitol se emplearon 4 fragmentos (*up*, m-HPH, m-MDH y *down*) y se obtuvo tres clones, de los cuales sólo dos lograron finalmente crecer en el medio mínimo manitol. En cambio, y a pesar de que para la transformación de una cepa de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ resistente al antibiótico higromicina B también se obtuvieron 3 colonias, las tres presentaron el módulo m-HPH integrado en su genoma. En el caso de la transformación para obtener cepas con un mayor número de módulos, se deberán ir agregando más módulos de manera paulatina (*up*, m-HPH, m-MDH, m-noxE, M-TM, m-ADH, m-PDC, *down*), lo que disminuiría la probabilidad de obtener

transformantes. Debido a que no existen modificaciones importantes de la técnica de DNA *assembler* (Shao y Zhao, 2009a, 2013b), se plantea la técnica de Gibson (2009) como una alternativa eficiente que permita inicialmente hibridar los módulos *in-vitro* para luego ser transformados en la levadura, disminuyendo considerablemente la probabilidad de eventos azarosos desafortunados. Empleando esta técnica, ciertas limitaciones relativas a la técnica podrían mejorar aún más la eficiencia de las próximas transformaciones. Uno de ellos es el largo de los extremos homólogos a ser recombinados, donde la longitud de los fragmentos homólogos influye en el éxito de la transformación. En el caso de las transformaciones realizadas en este trabajo, las regiones adicionales incluidas por partidores a cada segmento de DNA corresponden a 26 pb, lo que entrega productos finales con 52 pb de homología entre dos fragmentos. A diferencia de lo que realizó Werner (2012), donde se obtuvieron secuencias homólogas de 92 pb y otras de 46 pb, en este trabajo se utilizaron dos partidores con igual número de partidores homólogos en los extremos (ambos de 52 pb). Por esta razón, es recomendable que para las futuras transformaciones se consideren regiones de homología de mayor tamaño en los extremos de los fragmentos de DNA que se co-transformarán en la levadura.

5. CONCLUSIONES

- Se amplificaron y clonaron correctamente los genes de interés para incorporar el metabolismo del manitol en *S. cerevisiae* con la finalidad de obtener una cepa productora de bioetanol a partir de la fermentación de este poliol: ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1), PDC1 (piruvato decarboxilasa 1), *noxE* (NADH oxidasa citosólica), YNR073c (putativa manitol deshidrogenasa)
- Utilizando la técnica de PCR recursivo en conjunto con la técnica de PCR de elongación se construyó correctamente el cDNA del gen VDBG_02539, que codifica para una putativa permeasa de polioles del hongo *Verticillium albo-atrum*.
- Aplicando la técnica *DNA assembler* se transformó la cepa industrial Ethanol Red™ de *S. cerevisiae* con el fin de hacerla resistente al antibiótico higromicina B al insertar un módulo de expresión del gen *hph* de *E.coli* en la región YPRC τ 3 del genoma de la levadura, generando la cepa shphRSc. Fue admisible confirmar que la tecnología manifestada permite transformar no tan sólo cepas de *S. cerevisiae* de laboratorio, sino también en cepas industriales ampliamente utilizadas en fermentación alcohólica.

Se obtuvo dos cepas industriales de *S. cerevisiae* capaces de crecer aeróbicamente en medio mínimo manitol (SM), denominadas sMDHc 1 y sMDHc 2, al integrar cromosómicamente en la levadura el módulo de

expresión para el gen YNR073c (putativa manitol deshidrogenasa) de la cepa de *S. cerevisiae* de laboratorio S288c. Se puede inferir entonces que el producto génico de este gen críptico codifica para una enzima funcional capaz de desviar el manitol a la vía glicolítica.

- La integración del módulo de expresión para el gen YNR073c, así como la inducción en medios de cultivo ricos en manitol, permitió obtener una cepa capaz de producir etanol desde manitol en condiciones de cultivo aeróbicas y agitación moderada (30 °C y 95 rpm). La cepa SMDHc 2 produjo ~4,34 g/l de etanol en medio YPM que contiene 20 g/l de manitol luego de 50 horas de cultivo.

6. PROYECCIONES

- Utilizar los módulos de expresión construidos en este trabajo para generar cepas de *S. cerevisiae* Ethanol Red™ portadoras de los módulos m-HPH, m-MDH y m-NoxE con el fin de evaluar el efecto de la NADH oxidasa citosólica en la producción de etanol en condiciones anaeróbicas estrictas.
- Utilizar el cDNA del gen de *Verticillium* para sintetizar un módulo de expresión que permita obtener una nueva cepa portadora de este gen y comparar con las cepas ya obtenidas.
- Evaluar la aplicabilidad de la técnica de Gibson para optimizar la eficiencia de transformación al aumentar el número de fragmentos co-transfectados y recombinados *in vivo* en la levadura.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acland, A. y col. 2013. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research* 41(D1): D8-D20.
- Adams, J. M., y col. 2009. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *Journal of applied Phycology* 21(5): 569-574.
- Adams, J. M. y col. 2011. Seasonal variation in the chemical composition of the bioenergy feedstock *Laminaria digitata* for thermochemical conversion. *Bioresource Technology* 102: 226-234
- Alper, H., y Stephanopoulos, G. 2009. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential?. *Nature Reviews Microbiology* 7(10): 715-723.
- Amati, B. B., y Gasser, S. M. 1988. Chromosomal ARS and CEN elements bind specifically to the yeast nuclear scaffold. *Cell* 54(7): 967-978.
- Amorim, H. y col. 2011. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91: 1267-1275
- Antikainen, P. J. 1959. A comparative study on the chelate formation between germanic acid and some glycols and polyalcohols in aqueous solutions. *Acta chemica Scandinavica*: 13(2).
- Arica, B. y col. 2002. 5-Fluorouracil encapsulated alginate beads for the treatment of breast cancer. *International journal of pharmaceutics* 242(1): 267-269.
- Attfield, P. y Bell, P. 2003. Genetics and classical genetic manipulations of industrial yeasts. *Functional genetics of industrial yeasts*. Springer, Berlin, 17-25.
- Babrzadeh, F y col. 2012. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. *Molecular Genetics and Genomics* 287(6): 485-494.
- Bai Flagfeldt, D y col. 2009. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 26: 545-551.
- Barbosa, M. J. y col. 2003. Optimisation of cultivation parameters in photobioreactors for microalgae cultivation using the A-stat technique. *Biomolecular Engineering* 20(4): 115-123.
- Bennetzen, J. L., y Hall, B. D. 1982. The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 257(6): 3018-3025.
- Bidenne, C. y col. 1992. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* 22(1): 1-7.

Blochlinger, K. y Diggelmann, H. 1984. Hygromycin B phosphotransferase as a Selectable Marker for DNA Transfer Experiments with Higher Eucaryotic Cells. *Molecular and Cellular Biology* 4(12):2929-2931.

Boles, E. y Hollenberg, C. P. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS microbiology reviews* 21(1): 85-111.

Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Progress in industrial microbiology* 35: 313-321.

BP. 2013. *BP Statistical Review of World Energy 2013*. 40-42

Bradbury, J. y col. 2006. A homozygous subset of commercial wine yeast strains. *Antony van Leeuwenhoek* 89:27-37

Briand, X. y Morand, P. 1997. Anaerobic Digestion of *Ulva* Sp. 1. Relationship Between *Ulva* Composition and Methanisation. *Journal of Applied Phycology* 9(6): 511-524.

Bro, C. y col. 2006. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metabolic engineering*, 8(2), 102-111.

Brown, M. T. y col. 1997. Seasonal growth of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* in New Zealand. *Marine Biology* 129(3): 417-424.

Bryksin, A. V. y Matsumura, I. 2010. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *BioTechniques* 48(6): 463.

Chappells, H. y Shove, E. 2005. Debating the future of comfort: environmental sustainability, energy consumption and the indoor environment. *Build Research and Inform* 33: 32-40

Chynoweth, D. P. y Srivastava, V. J. 1980. Methane production from marine biomass. *International symposium on biogas, microalgae, and livestock wastes*. Taipei, Taiwan: 27

Ciriacy, M. 1975. Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Isolation and genetic analysis of *adh* mutants. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 29(3): 315-325.

Connor, M. y Atsumi, S. 2010. Synthetic biology guides biofuel production. *J Biomed Biotechnol*: Volume 2010, Article ID 541698, 9 páginas

Contreras, G. 2012. Sobreexpresión de genes ensamblados mediante recombinación homóloga en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de título para optar al título de Ingeniero en biotecnología molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Cribb, A. B. 1954. *Macrocystis pyrifera* (L.) Ag. in Tasmanian waters. *Marine and Freshwater Research* 5(1): 1-34.

Da Silva, N. A. y Srikrishnan, S. 2012. Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* **12**(2): 197-214.

Danielsen, F. y col. 2009. Biofuel plantations on forested lands: double jeopardy for biodiversity and climate. *Conservation Biology* **23**(2): 348-358.

Dawes, C. y col. 1974. Ecological studies of Floridian Eucheuma (Rhodophyta, Gigartinales). III. Seasonal variation of carrageenan, total carbohydrate, protein, and lipid. *Bulletin of Marine Science* **24**(2): 286-299.

Dermoun, D. y col. 1992. Modeling of growth of *Porphyridium cruentum* in connection with two interdependent factors: light and temperature. *Bioresource Technology* **42**: 113-117

Devantier, R. y col. 2005. Transcription analysis of *S. cerevisiae* in VHG fermentation: The genome-wide transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* during very high gravity ethanol fermentations is highly affected by the stationary phase. *Industrial Biotechnology* **1**(1): 51-63.

Dimitrov, K. 2007. GreenFuel technologies: a case study for industrial photosynthetic energy capture. Auto publicado y disponible en www.nanostring.net/Algae/CaseStudy.pdf.

Doezema, P., y Phillips Jr, J. H. 1970. Glycogen storage and synthesis in the gut of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **34**(3): 691-697.

Eardley, D. D. y col. 1990. MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR SULFATED POLYSACCHARIDES ON THE SURFACE OF MACROCYSTIS PYRIFERA (PHAEOPHYCEAE) 1. *Journal of Phycology* **26**(1): 54-62.

Enquist-Newman, M. y col. 2014. Efficient ethanol production from Brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform. *Nature* **505**: 239-246.

Evers, E. G. 1991. A model for light limited continuous cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **38**: 254-259

FAO. 2012. El Estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2000. Food & Agriculture Organization of the United Nations.

Fargione, J. y col. 2008. Land Clearing and the Biofuel Carbon Debt. *Science* **319**: 1235-1238

Farkaš, V. y col. 1973. Extracellular β -glucanases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* **321**(1): 246-255.

Förster, J., y col. 2003. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome research* **13**(2): 244-253.

Frankfurt School-UNEP Centre/BNEF. 2013. Global Trends in Renewable Energy Investment 2013. P 11

Franks, F. y col. 1974. Conformation and hydration of sugars and related compounds in dilute aqueous solution. In *The Physical Chemistry of Aqueous System*: 1-20. Springer US.

Frohlich, B. y col. 1983. Photobioreactors: Models for interaction of light intensity, reactor design and algal physiology. *Biotech. Bioeng. Symp.* **13**: 331-350

Gacesa, P. 1992. Enzymic degradation of alginates. *International journal of biochemistry* **24**(4): 545-552.

Geertman, J. y col. 2006. Engineering NADH-metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: formate as an electron donor for glycerol production by anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Research* **6**: 1193-1203

Geueke, B. y col. 2002. NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: a new catalust for the regeneration of NAD. *Enzyme and Microbial Technology* **32**: 205-2011

Giaever, G. y col. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**: 387-391

Gibson, D. y col. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* **6**(5): 343-347

Goffeau, A. y col. 1996. Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546(5287), 546-567

Grasdalen, H. 1983. High-field, ¹Hn. mr spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. *Carbohydrate Research* **118**: 255-260.

Gritz, L., y Davies, J. 1983. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **25**(2): 179-188.

Gu, Z. y col. 2005. Elevated evolutionary rates in the laboratory strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(4): 1092-1097.

Gutiérrez, A. y col. 2006. Farming of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* in southern Chile for development of novel food products. *Journal of Applied Phycology* **18**(3-5): 259-267.

Gutiérrez-Lomelí, M. y col. 2008. Overexpression of ADH1 and HXT1 genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* improves the fermentative efficiency during tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* **93**: 363-371.

- Hase, R. y col. 2000. Photosynthetic production of microalgal biomass in a raceway system under greenhouse conditions in Sendai city. *Journal of bioscience and bioengineering* **89**(2): 157-163.
- Haulf, J. y col. 2000. Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial technology* **26**: 688-698.
- Higuchi, R. y col. 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research* **16**: 7351-7367.
- Ho, Y. y col. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**(6868): 180-183.
- Hörner, S. y col. 2001. The crystallographic structure of the mannitol 2-dehydrogenase NADP⁺ binary complex from *Agaricus bisporus*. *Journal of biological chemistry* **276**(29): 27555-27561.
- Horn, S. J. y col. 2000. Ethanol production from seaweed extract. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **25**(5): 249-254.
- Horton, R. M. y col. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**(1): 61-68.
- Hu, Q. y col. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* **54**(4): 621-639.
- Hug, A.M. y Feldmann, H. 1996. Yeast retrotransposon Ty4: the majority of the rare transcripts lack a U3-r sequence. *Nucleic Acids Research* **24**: 2338-2346.
- Huang, B. y col. 2008. Heterologous production of secondary metabolites as pharmaceuticals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters* **30**: 1121-1137
- Hult, K. y Gatenbeck, S. 1978. Production of NADPH in the mannitol cycle and its relation to polyketide formation in *Alternaria alternata*. *European Journal of Biochemistry* **88**(2): 607-612.
- Ingram, L. O. y col. 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnology and bioengineering* **58**(2-3): 204-214.
- Ito, K., y Hori, K. 1989. Seaweed: chemical composition and potential food uses. *Food reviews international*, **5**(1): 101-144.
- Jackson, G. A. 1977. Nutrients and production of giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, off southern California. *Limnology and Oceanography* **22**(6): 979-995.

Jang, J. S. y col. 2012. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess and biosystems engineering* **35**(1-2): 11-18.

Jennings, D. H. 1985. Polyol metabolism in fungi. *Advances in microbial physiology* **25**: 149-193.

John,R. y col. 2011. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology* **102**(1): 186-193.

Johnson, M. B., y Wen, Z. 2009. Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. *Energy & Fuels* **23**(10): 5179-5183.

Jordan, D. y col. 2012. Plant cell walls to ethanol. *The Biochemical journal* **442**(2): 241

Juchaux-Cachau, M. y col. 2007. Characterization of AgMaT2, a plasma membrane mannitol transporter from celery, expressed in phloem cells, including phloem parenchyma cells. *Plant Physiology* **145**(1): 62-74

Kahn, S. y col. 2012. Chapter 9: Energy End-Use: Transportation. Executive Summary P 578

Kalscheuer, R. y col. 2006. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiology* **152**(9): 2529-2536.

Karsten, U. y col. 1997. Characterization of mannitol metabolism in the mangrove red alga *Caloglossa leprieurii* (Montagne) J. Agardh. *Planta* **201**(2): 173-178.

Kasting, J. y Siefert, J. 2002. Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* **296**(5570): 1066-1068.

Keplek, Y. y col. 2004. *Arabidopsis* POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺-Symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *The Plant Cell* **17**(1): 204-218

Kim, N. J. y col. 2011. Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Bioresource technology* **102**(16): 7466-7469.

King, G. A. y col. 1987. Alginate-Polylysine Microcapsules of Controlled Membrane Molecular Weight Cutoff for Mammalian Cell Culture Engineering. *Biotechnology progress* **3**(4): 231-240.

Krogan, N. J. y col. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**(7084): 637-643.

Kulov, N.N. 1996. Gas (vapor) Liquid Systems. Nova Sciences Publisher. P 48.

Länge-Rouault, F., y Jacobs, E. 1995. A method for performing precise alterations in the yeast genome using a recyclable selectable marker. *Nucleic acids research* **23**(15): 3079.

Lee, K. Y. y Mooney, D. J. 2012. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science* **37**(1): 106-126.

Lee, R. A., y Lavoie, J. M. 2013. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers* **3**(2): 6-11.

Lee, SM. y Lee, JH. 2011. Ethanol fermentation for main sugar components of Brown-algae using various yeasts. *Journal of Industrial and Engineering chemistry* **18**: 16-18.

Lee, T. y col. 2002. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **298**(5594): 799-804.

Lee, W. 1967. Mannitol acetyl phosphate phosphotransferase of *Aspergillus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **29**(3): 337-342.

Lem, E y Glick, B. 1985. Biotechnological uses of cyanobacteria. *Biotechnology advances* **3**(2): 195-208

Lewis, D. H., y Smith, D. C. 1967. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism. *New Phytologist* **66**(2): 143-184.

Ma, L. J. y col. 2008. Annotation of *Verticillium albo-atrum* VaMs. 102. Enviado a la base de datos de EMBL/GenBank/DDBJ.

Marchler-Bauer, A. y col. 2013. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic acids research* **41**(D1): D348-D352.

Martone, P. T. y col. 2009. Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Current Biology* **19**(2): 169-175.

Matsushika, A. y col. 2009. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* **100**: 2392-2398.

Maxwell, W. A. y Spoerl, E. 1971. Mannitol uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* **105**(3): 753-758.

McCormick, P. V., y Cairns Jr, J. 1994. Algae as indicators of environmental change. *Journal of Applied Phycology* **6**(5-6): 509-526

McFeeters, R. y Kuang-Hus, C. 1986. Utilization of electron acceptors for anaerobic mannitol metabolism by *Lactobacillus plantarum*. Compounds which serve as electron acceptors. *Food Microbiology* **3**:73-81

McKee, J. y col. 1992. Alginate content and composition of *Macrocystis pyrifera* from New Zealand. *Journal of applied phycology* 4(4): 357-369.

Mian, A. J. y Percival, E. 1973. Carbohydrates of the brown seaweeds *himanthalia lorea*, *bifurcaria bifurcata*, and *Padina pavonia*: Part I. extraction and fractionation. *Carbohydrate Research* 26(1): 133-146

Molina Grima, E. y col. 1993. N-3 PUFA Productivity in Chemostat Culture of Microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 599-605.

Molina Grima, E. y col. 1996. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology* 45: 59-69.

Morawski, K. y col. 2003. Role of Mannitol in Reducing Postischemic Changes in Distortion-Product Otoacoustic Emissions (DPOAEs): A Rabbit Model. *The Laryngoscope* 113(9): 1615-1622.

Moreno, C. A., y Jara, F. 1984. Ecological studies on fish fauna associated with *Macrocystis pyrifera* belts in the south of Fuegian Islands, Chile. *Marine ecology progress series*. Oldendorf 15(1): 99-107.

Morris, E. R. y col. 1980. Characterisation of alginate composition and block-structure by circular dichroism. *Carbohydrate research* 81(2): 305-314.

Mortimer, R. K. 2000. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Research* 10(4): 403-409.

Mortimer, R. K. y Johnston, J R. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* 113: 35-43.

Msuya, F. E. y Neori, A. 2002. *Ulva reticulata* and *Gracilaria crassa*: Macroalgae That Can Biofilter Effluent from Tidal Fishponds in Tanzania. *Western Indian Ocean J. Mar. Sci.* 1: 117-126.

Naik, S. y col. 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 578-597

Ndimba, B. y col. 2013. Biofuels as a sustainable energy source: An update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. *J proteomics* 93: 234-244

Nigam, P. y Singh, A. 2010. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energy Combust. Sci.* doi:10.1016/j.pecs.2010.01.003

Niklitshek, M. y col. 2008. Genomic organization of the structural genes controlling the asthaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research* **41**: 93-108.

Noiraud, N. y col. 2001. Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *The plant cell* **13**(3): 695-705

Norambuena, R. 1996. Recent trends of seaweed production in Chile. In Fifteenth International Seaweed Symposium celebrado en Enero de 1996. P 371-379.

Ochiai, A. y col. 2006. A biosystem for alginate metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* strain C58: Molecular identification of Atu3025 as an exotype family PL-15 alginate lyase. *Research in microbiology* **157**(7): 642-649.

Ochiai, A. y col. 2010. Crystal structure of exotype alginate lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Biological Chemistry* **285**(32): 24519-24528.

Ok Yu, K. y col. 2011. Improvement of Ethanol yield from glycerol via conversion of pyruvate to ethanol in metabolically engineered *Sacchromyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **166**: 856-865.

Ostergaard, S. y col. 2000. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**(1): 34-50.

Ortiz Viedma, J. 2011. Composición nutricional y funcional de algas pardas chilenas: *Macrocystis pyrifira* y *Durvillaea antarctica*. Monografía Facultad de Ciencias Químicas y farmacéuticas. Universidad de Chile.

Ota, A. y col. 2013. Production of ethanol from mannitol by the yeast strain *Saccharomyces paradoxus* NBRC 0259. *Journal of bioscience and bioengineering*.

Özcan, S. y Johnston, M. 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**(3): 554-569.

Park, J. H. y col. 2012. Anaerobic digestibility of algal bioethanol residue. *Bioresource technology* **113**: 78-82.

Peng, X. y col. 2011. Characterization of the mannitol catabolic operon of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology* **91**(5): 1375-1387

Perfect, J. R. y col. 1996. Identification of a *Cryptococcus neoformans* gene that directs expression of the cryptic *Saccharomyces cerevisiae* mannitol dehydrogenase gene. *Journal of bacteriology* **178**(17): 5257-5262.

- Pitkanen, E. y Pitkanen, A. 1964. POLYHYDRIC ALCOHOLS IN HUMAN URINE. II. In *Annales medicinae experimentalis et biologiae Fenniae* 42: 113.
- Preiss, J., y Ashwell, G. 1962. 3-Deoxy-D-glycero-2, 5-hexodiulosonic acid, a new intermediate in the metabolism of polygalacturonate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 8(5): 357-360.
- Prodromou, C., y Pearl, L. H. 1992. Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Engineering Design and Selection* 5(8): 827-829.
- Pronk, J. T. y col. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12(16): 1607-1633.
- Pruden, A. y col. 2006. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environmental science & technology* 40(23): 7445-7450.
- Qi, Y. y col. 2011. Introduction of heterogeneous NADH reoxidation pathways into *Torulopsis glabrata* significantly increases pyruvate production efficiency. *The Korean Journal of chemical engineering* 28(4): 1078-1084
- Quain, D. E., y Boulton, C. A. 1987. Growth and metabolism of mannitol by strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general microbiology* 133(7): 1675-1684.
- Rachidi, N. y col. 2000. Examination of the transcriptional specificity of an enological yeast. A pilot experiment on the chromosome-III right arm. *Current genetics* 37(1): 1-11.
- Read, S. M. y col. 1996. Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. *Carbohydrate research*, 281(2): 187-201.
- Reddy, VS. y col. 2012. The major superfamily (MFS) revisited. *The FEBS journal* 279(11): 2022-2035
- Reijnders, L., y Huijbregts, M. A. J. 2008. Palm oil and the emission of carbon-based greenhouse gases. *Journal of cleaner production*, 16(4): 477-482.
- Reith, H. y col. 2009, September. Seaweed potential in the Netherlands. In ECN Biomass, Coal and Environmental Research Kick-off Meeting EOS-LT project Seaweed Biorefinery 24.
- Rin Kim, S. y col. 2012. High expression of XYL2 coding for xylitol dehydrogenase is necessary for efficient xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* 14(4): 336-343.
- Rioux, L. y col. 2007. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate polymers* 69(3): 530-537.

- Rodolfi, L. y col. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering* **102**(1): 100-112.
- Roesijad, G. y col. 2010. Macroalgae as a biomass feedstock: a preliminary analysis, PNNL 19944. Pacific Northwest National Laboratory, USA CrossRef. Feedstock: A Preliminary Analysis. US DOE, PNNL-19944.
- Rothstein, R. 1991. Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: Integrative DNA transformation in yeast. *Methods in enzymology* **194**: 281-301.
- Rosell, K. G., y Srivastava, L. M. 1984. Seasonal variation in the chemical constituents of the brown algae *Macrocystis integrifolia* and *Nereocystis luetkeana*. *Canadian journal of botany* **62**(11): 2229-2236.
- Rosenthal, R. J y col. 1974. Ecology and natural history of a stand of giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, off Del Mar, California. *Fish. Bull* **72**(3): 670-684.
- Salmon, J. M. 1997. Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of fermentation and bioengineering* **83**(3): 253-260.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmatz, D. M. y col. 1989. Evidence for and characterization of a mannitol cycle in *Eimeria tenella*. *Molecular and biochemical parasitology* **32**(2): 263-270.
- Scott, S. A. y col. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology* **21**(3): 277-286.
- Searchinger, T. y col. 2006. Use of U.S. Croplands for Biofuels Increases Greenhouse Gases Through Emissions from Land Use Change. *Science* **319**(5867): 1238-1240.
- Shao, Z. y Zhao, H. 2009. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Research* **37**: e16.
- Shao, Z. y Zhao, H. 2013. Construction and engineering of large biochemical pathways via DNA assembler. *Methods in molecular biology* **1073**: 85-106
- Sicard, P. J. y Leroy, P. 1983. Mannitol, sorbitol and lycasin: Properties and food applications. *Developments in Sweeteners—2*. London and New York: Elsevier-Applied Science Publishers.
- Solomon, P y col. 2006. Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch). *Biochem. J.* **399**: 231-239.

- Solomon, P. y col. 2007. Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends in microbiology* **15**(6): 257-262.
- Somerville, C. y col. 2010. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science*(Washington) **329**(5993): 790-792.
- Stephanopoulos, G. 2007. Challenges in engineering microbes for biofuel production. *Science* **315**: 801-804
- Stevenson, R. J. y col. 1996. *Algal ecology: Freshwater benthic ecosystem*. Libro disponible en línea via Elsevier.
- Stoop, J. M. y col. 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science* **1**(5): 139-144.
- Strandberg, G. W. 1969. D-mannitol metabolism by *Aspergillus candidus*. *Journal of bacteriology* **97**(3): 1305-1309.
- Suga, H. y col. 2013. Implementation of a transhydrogenase-like shunt to counter redox imbalance during xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology* **97**(4): 1669-1678.
- Takase, R., y col. 2010. Molecular identification of unsaturated uronate reductase prerequisite for alginate metabolism in *Sphingomonas sp.* A1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **1804**(9): 1925-1936.
- Takeda, H. y col. 2011. Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria. *Energy & Environmental Science* **4**(7): 2575-2581.
- Tanino, T. y col. 2010. Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation. *Bioenergy and Biofuels* **88**: 1215-1221.
- Tester, J. y col. 2006. *The future of Geothermal Energy: Impact of Enhanced Geothermal Systems (EGS) on the United States in the 21st century*. Massachusetts Institute of Technology. 18
- Thomas, F. y col. 2012. Characterization of the first alginolytic operons in a marine bacterium: from their emergence in marine Flavobacteriia to their independent transfers to marine Proteobacteria and human gut Bacteroides. *Environmental Microbiology* **14**(9): 2379-2394.
- Tokuhiro, K. y col. 2009. Double mutation of the PDC1 and ADH1 genes improves lactate production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing the bovine lactate dehydrogenase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**(5): 883-890.

- Torres, M. R. y col. 2007. Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil. *Carbohydrate research*, **342**(14), 2067-2074.
- Trip, P. y col. 1964. Metabolism of mannitol in higher plants. *American Journal of Botany*, 828-835.
- Turvey, J. y Christison, J. 1967 . The hydrolysis of algal galactans by enzymes from a *Cytophaga* species. *The Biochemical. Journal* **105**: 311-316.
- Ueng, S. y col. 1976. D-Mannitol dehydrogenase from *Absidia glauca*. Purification, metabolic role, and subunit interactions. *Biochemistry* **15**(8): 1743-1749.
- U.S. Energy Information Administration. 2013. International Energy Outlook 2013. Capítulo I: World energy demand and economic outlook. 8-9
- Vergara-Fernández, A. y col. 2008. Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. *Biomass and Bioenergy* **32**(4): 338-344.
- Véléz, H. y col. 2007. Mannitol metabolism in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Fungal Genetics and Biology* **44**(4): 258-268.
- Vinson, J. A. y col. 1989. In vitro and in vivo reduction of erythrocyte sorbitol by ascorbic acid. *Diabetes* **38**(8): 1036-1041.
- Walfridsson, M y col. 1997. Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* XYL1 and XYL2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilisation. *Applied microbiology and biotechnology* **48**(2): 218-224.
- Wargacki, y col. 2012. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science*, **335**(6066): 308-313.
- Westermeier, R. y col. 2012. Variations of chemical composition and energy content in natural and genetically defined cultivars of *Macrocystis* from Chile. *Journal of Applied Phycology* **24**(5): 1191-1201.
- Werner, N. 2012. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* con genes de *Xanthophyllomyces dendrorhous* para producción de carotenoides. Tesis para optar al título de ingeniera en biotecnología molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Wi, S. y col. 2013. Bioethanol production by rice straw by popping pretreatment. *Biotechnology for biofuels*: **6**(1) 166
- Wong, T. Y. y col. 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annual Reviews in Microbiology* **54**(1): 289-340.

Wodicka, L. y col. 1997. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature biotechnology* 15(13): 1359-1367.

WWF. 2012. Living Planet Report. Capítulo N° 1: The State of the planet. 18-19

Yanagisawa, M. y col. 2011. Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. *Process Biochemistry* 46(11): 2111-2116.

Zemke-White, W. y Ohno, M. 1999. World seaweed utilisation: an end-of-century summary. *Journal of Applied Phycology* 11(4): 369-376.

Zhang, GC. y col. 2012. Decreased xylitol formation during xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* due to overexpression of water-forming NADH oxidase. *Applied and Environmental Microbiology* 78(4): 1081-1086.

Zhang, L. y col. 2011. Improving the ethanol yield by reducing glycerol formation using cofactor regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters* 33(7): 1375-1380.