



Tesina para optar por el grado de Licenciada en Ciencias Biológicas  
Profundización en Biología Molecular

# Construcción de una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*, de origen industrial, capaz de producir etanol como producto de la fermentación de xilosa

**Bach. Lucía Coimbra Baglivo**

**Orientadora: Silvia Batista**

**Co-orientadora: Ana Karen Malan**

Grupo Microbiología Molecular-Departamento BIOGEM  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay

**Setiembre, 2018**



## ➤ AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Karen y a Silvia por haberme orientado durante toda la tesina con una enorme paciencia, motivación y constante disposición para ayudarme siempre. Fue un placer para mí tenerlas como co-tutora y tutora.

A Mairan por estar dispuesta a ayudarme siempre y abrirme las puertas de Facultad de Ingeniería.

A mis amigos de la facultad que sin dudas son lo mejor que me llevo de esta carrera, con ustedes me siento siempre “en casa”. Especialmente a mis Biologuís del alma: Ana con su hiperactividad absoluta y total “relax” sobre como tomarse la vida, te has vuelto una ternura con el tiempo y me has enseñado lecciones de vida que nunca voy a olvidar, a Jime por su pachorra que me encanta, sus charlas filosóficas y su oído, Sofi por su sinceridad a veces tajante y ternura camuflada (todas sabemos que en el fondo sos un dulce de leche más) y a Juli por su sinceridad, apoyo y sensibilidad. A Guille por sus zarandeos que me hacen caer en la realidad de la vida, a Cata (mi futura socia) por su paz y humor, a Joaco por su ternura (no muy bien recibida en los momentos de estrés), a Pedro por sus charlas sobre lo importante de la vida y por último, a mi hippie preferida: Gabi, por sus apuntes, sus locuras y su energía (a veces demasiado explosiva jaja).

Sin dudas quiero agradecer particularmente a Flo y Mati, amigas y compañeras de escritura, felicidad y sufrimiento todo junto. Sin ustedes este proceso nunca hubiera sido lo mismo, son LO MAS.

A mis amigos del liceo y la escuela: Isidoras, Angie, Viki, Caro B, Caro M , Caro G, Tute, Anto, Fede, Marce, Juani y Fer por estar siempre a mi lado, entender mis ausencias prolongadas por estudio e igual seguirme queriendo.

A toda mi familia, a mis tíos, aquellos que han estado presentes siempre y a mis abuelos que son lo más lindo que me regaló la vida, siempre pendientes y alegres por mis logros, motivándome en todo momento. A Ale, por su oído, compañía y cariño.

A Marcos, mi compañero de vida durante toda esta carrera, a sus gloriosos apuntes y sobre todo al apoyo constante que me brinda en todos los aspectos de mi vida. Solo vos sabes lo movido que ha sido este último año para mí y agradezco infinitamente tenerte en mi vida, sin vos este proceso no hubiera sido lo mismo, contigo crecí y espero seguir creciendo.

A Pepe, Danilo y Loli, la mejor segunda familia que pude tener.

Y por último, pero no menos importante, a mis padres por ser los pilares de mi vida. Gracias a su apoyo incondicional en TODO sentido pude lograr esto. A mamá quiero agradecerle especialmente sus locuras energéticas y mimos que me aliviaron en muchos momentos de estrés y llanto; y a papá por obligarme a tener espacios de relajación para pachorrear juntos.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
2.1	Biocombustibles.....	3
2.2	Producción de biocombustibles de segunda generación .....	4
2.3	Producción de bioetanol .....	6
2.4	Transporte y metabolismo de xilosa en <i>S.cerevisiae</i> .....	7
2.4.1	Permeasas.....	7
2.4.2	Vías metabólicas para la asimilación de xilosa .....	9
2.4.2.1	Vía Xilosa Isomerasa.....	11
2.4.2.2	Vía oxo-reductiva .....	12
2.5	Estadísticas, cepas y actualidad .....	13
2.5.1	Avances políticos y estadísticas sobre la producción de etanol.....	13
2.5.2	Producción de etanol de segunda generación a nivel industrial.....	14
2.5.3	Cepas recombinantes creadas hasta la fecha y rendimiento de etanol 15	
2.6	Antecedentes del proyecto: cepas de estudio.....	18
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>4</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	22
4.1	Objetivos específicos .....	22
<b>5</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
5.1	Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento.....	23
5.2	Construcción del vector pRS42K::XI y de las cepas CAT-1 (pRS42K::XI), CAT-1-XRT (pRS42K::XI) y CAT-1-XIT (pRS42K::XI) .....	25
5.2.1	Extracción del plásmido por lisis alcalina <sup>61</sup> .....	25
5.2.2	Amplificación del fragmento pTPI1-piroXylA-tCYC1 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26

5.2.3	Purificación del fragmento amplificado por PCR.....	27
5.2.4	Construcción del plásmido pRS42K::XI: digestión del vector pRS42K y ligación con el fragmento amplificado.....	28
5.2.5	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> TOP10 <sup>62</sup> .....	29
5.2.6	Transformación de células de <i>E. coli</i> TOP10 (químicamente competentes) con la mezcla de ligación <sup>62</sup> .....	29
5.2.7	Selección del plásmido pRS42K::XI.....	30
5.2.8	Transformación de levaduras (protocolo modificado de Gietz, D. y col, 1992 <sup>64</sup> )	30
5.2.9	Ensayos de evoluciones.....	31
5.3	Ensayos de producción de etanol.....	32
5.3.1	Evaluación del consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento.....	33
5.3.2	Evaluación del crecimiento y consumo de xilosa a las 72 horas de incubación de CAT-1-XIT (pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evolución en presencia de diferentes concentraciones de xilosa.....	33
5.3.3	Perfil de crecimiento, consumo de xilosa y producción de etanol de la cepa CAT-1-XIT pRS42K::XI 10 <sup>ma</sup> evolución.....	34
5.3.4	Determinaciones analíticas.....	34
5.3.4.1	Biomasa.....	34
5.3.4.2	Xilosa y etanol.....	34
5.3.4.3	Ensayos estadísticos.....	35
6	<b>RESULTADOS</b> .....	36
6.1	Construcción del plásmido pRS42K::XI.....	36
6.1.1	Amplificación del fragmento pTPI1-XI-tCYC1 mediante PCR.....	36
6.1.2	Digestión del vector pRS42K y ligación con el amplicón purificado ...	39
6.1.3	Transformación química de células de <i>E. coli</i> TOP10 con la mezcla de ligación.	39

6.1.4	Verificación de la construcción deseada en los plásmidos purificados	40
6.1.5	Transformación de levaduras.....	42
6.1.6	Evolución .....	42
6.2	Ensayos de producción.....	42
6.2.1	Evaluación de consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento. ....	42
6.2.2	Evaluación del <i>pool</i> CAT-1-XIT (pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evolución crecido durante 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de xilosa. ....	45
6.2.1	Perfil de crecimiento, consumo de xilosa y producción de etanol de CAT-1-XIT(pRS42K::XI)(10 <sup>ma</sup> evolución). ....	47
7	<b>DISCUSIÓN</b> .....	49
7.1	Ensayos de producción de etanol.....	50
7.1.1	Evaluación del consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento. ....	50
7.1.1.1	Posibles efectos de la aplicación del protocolo de evolución .....	51
7.1.1.2	Productos secundarios de fermentación .....	53
7.1.1.2.1	Ácido láctico .....	54
7.1.1.2.2	Glicerol.....	55
7.1.1.3	Rendimiento de etanol.....	56
7.1.2	Evaluación del crecimiento y consumo de xilosa a las 72 horas de incubación de CAT-1-XIT (pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evolución en presencia de diferentes concentraciones de xilosa. ....	57
7.1.2.1	Glicerol.....	59
7.1.3	Perfil de crecimiento, consumo de xilosa y producción de etanol de la cepa CAT-1-XIT (pRS42K:XI) 10 <sup>ma</sup> evolución. ....	59
7.1.3.1	Factores que pueden influir en la producción de bioetanol.....	60
7.1.3.1.1	Inhibición debido a elevadas concentraciones de azúcar .....	60

7.1.3.1.2	Inhibición de crecimiento debido la cantidad de etanol producida	61
7.1.3.2	Rendimiento y productividad de etanol	62
7.2	Reflexiones finales	63
8	<b>CONCLUSIÓN</b>	65
9	<b>PERSPECTIVAS</b>	65
10	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	68
11	<b>ANEXO</b>	74
11.1	MATERIALES Y MÉTODOS	74
11.1.1	Medios de cultivo	74
11.1.1.1	Medio LB Modificado	74
11.1.1.2	Medio MM	74
11.1.1.3	Medio YPD	74
11.1.1.4	Medio YPX <sub>20 g/l</sub>	75
11.1.1.5	Medio YP(1/5)	75
11.1.2	Soluciones y buffers utilizados	75
11.1.2.1	5X LITE	75
11.1.2.2	PEG LITE	75
11.1.2.3	Soluciones de lisis alcalina	75
11.1.2.3.1	Solución I	75
11.1.2.3.2	Solución III	76
11.1.3	Herramientas moleculares	76
11.1.3.1	Electroforesis en gel de agarosa	76
12	<b>APENDICE</b>	77
12.1	RESULTADOS	77
12.1.1	Evaluación de consumo de xilosa y producción de etanol a las horas de crecimiento.	77

12.1.2 Evaluación del <i>pool</i> CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evolución crecido durante 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de xilosa. ....	78
12.1.3 Perfil de crecimiento, consumo de xilosa y producción de etanol de CAT-1-XIT (pRS42K::XI)(10 <sup>ma</sup> evolución). ....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> . ....	16
<b>Tabla 2</b> Cepas y plásmidos. ....	24
<b>Tabla 3</b> Cepas utilizadas en el ensayo de evaluación del consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento. ....	33
<b>Tabla 4</b> Evaluación de consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento de las nueve cepas de estudio en medio YP(1/5)X. ....	77
<b>Tabla 5</b> Evaluación de consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento de las nueve cepas de estudio en medio MM. ....	77
<b>Tabla 6</b> Evaluación de la fermentación del <i>pool</i> CAT-1-XIT(pRS42K::XI) a las 72 horas. ....	78
<b>Tabla 7</b> Evaluación de la fermentación del <i>pool</i> CAT-1-XIT(pRS42K::XI) a las 132 horas. ....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Vía de la xilosa isomerasa y vía oxo-reductiva. Figura extraída y modificada de Malan y col., (2016). ....	10
<b>Figura 2</b> Bloques con genes en tándem insertos en los alelos GRE3 de las cepas CAT-1 mutantes. ....	20
<b>Figura 3</b> Mapas de los plásmidos utilizados en este trabajo. ....	25
<b>Figura 4</b> Electroforesis en gel de agarosa en donde se visualiza el fragmento de ADN amplificado por PCR. ....	37
<b>Figura 5</b> Perfil electroforético en gel de agarosa en donde se visualizan los fragmentos de ADN amplificados por PCR para construir el plásmido pRS42K::XI. ....	38

<b>Figura 6</b> Perfil electroforético de la reacción de digestión del plásmido pRS42K con EcoRV.....	39
<b>Figura 7</b> Diagrama de corte y fragmentos esperados para el clonado del amplicón. ....	40
<b>Figura 8</b> Perfil electroforético en gel de agarosa de los plásmidos purificados a partir de ambos clones, digeridos con EcoRI.....	41
<b>Figura 9</b> Consumo de xilosa y producción de etanol y biomasa de las distintas cepas evaluadas.....	43
<b>Figura 10</b> Consumo de xilosa y producción de biomasa y etanol de las distintas cepas analizadas.....	44
<b>Figura 11</b> Consumo de xilosa y producción de etanol y biomasa de CAT-1-XIT(pRS42K::XI)10 <sup>ma</sup> evolución crecida en YP(1/5) y diferentes concentraciones de xilosa.....	45
<b>Figura 12</b> Gráfico del área del pico de glicerol y concentración final de xilosa en el sobrenadante de CAT-1-XIT(pRS42K::XI) en función de la concentración inicial de xilosa en medio YP(1/5)X.....	46
<b>Figura 13</b> Perfil de las concentraciones de xilosa y etanol producido por CAT-1-XIT(pRS42K::XI)10 <sup>ma</sup> evolución a lo largo del tiempo. ....	47

## 1 RESUMEN

---

La producción de biocombustibles de 1<sup>era</sup>-generación requiere de áreas exclusivas de cultivo, compitiendo con plantaciones con fines alimenticios y desplazando hábitats naturales. Esto impulsó la producción de biocombustibles de 2<sup>da</sup>-generación como el bioetanol, a partir de biomasa lignocelulósica. La misma está compuesta de: celulosa, hemicelulosa y lignina. La hemicelulosa contiene mayoritariamente xilosa, glucosa y arabinosa.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, usualmente empleada para producir bioetanol de 1<sup>era</sup>-generación por fermentación de hexosas, es incapaz de fermentar xilosa y arabinosa. Obtener una cepa capaz de fermentar todos los azúcares fermentables contenidos en la biomasa lignocelulósica permitirá mejorar los rendimientos de producción de este biocombustible. Las estrategias desarrolladas involucran la expresión heteróloga de genes de las vías oxo-reductiva o xilosa isomerasa.

El objetivo de este trabajo fue obtener cepas modificadas de *S. cerevisiae* capaces de producir etanol como producto mayoritario de la fermentación de xilosa. Para ello, se dispuso de dos cepas recombinantes de *S. cerevisiae* CAT-1, obtenidas por inserción en el cromosoma de genes involucrados en la asimilación y transporte de xilosa. La cepa CAT-1-XRT contiene dos genes de la vía oxo-reductiva de *Scheffersomyces stipitis*. La cepa CAT-1-XIT contiene el gen que codifica para xilosa isomerasa (XI) de *Streptomyces coelicolor*. Además, ambas cepas contienen copias extra de los genes homólogos XKS1 (xilulosa quinasa), TAL1 (transaldolasa) y Gal2-N376F (transportador). Estas cepas no lograron crecer en xilosa de forma apreciable. Estimando que el fenotipo obtenido se debe a la ausencia o baja expresión de los genes heterólogos, construimos un plásmido de alto número de copias (pRS42K::XI), con el gen *xylA* (XI) de *Piromyces* sp.. Este plásmido fue transferido a CAT-1, CAT-1-XRT y CAT-1-XIT. Luego de 10 etapas de evolución, se evaluó el consumo de xilosa y producción de etanol. El cultivo obtenido luego del último paso de evolución de la construcción CAT-1-XIT (pRS42K::XI), fue capaz de asimilar el 91,26% de xilosa contenida en un medio de cultivo con 20 g/L de xilosa

inicial y producir 6,78 g/L de etanol con un rendimiento muy bueno (0,404 g de etanol/g de xilosa).

En el marco de esta tesina se logró construir una cepa modificada de *S. cerevisiae* capaz de producir etanol como producto mayoritario de la fermentación de xilosa a través de la vía de isomerización.

## 2 INTRODUCCIÓN

---

El anunciado agotamiento de las reservas petroleras, combinado con la creciente demanda mundial de energía, han promovido el interés hacia la producción de biocombustibles en los últimos 20 años<sup>1</sup>. Otra preocupación en aumento está relacionada con los problemas ambientales que genera el consumo de los combustibles fósiles. Un claro ejemplo son las emisiones de gases con efecto invernadero. El uso de biocombustibles suele ser una opción más amigable con el medio ambiente. Esto se debe a que el balance de carbono de los mismos (en cuyo cálculo se incluye el consumo de carbono por fotosíntesis) es casi neutro en comparación con el de los combustibles derivados del petróleo (como la gasolina, el diesel o el queroseno)<sup>1</sup>.

### 2.1 Biocombustibles

Los biocombustibles se definen como aquellos combustibles que derivan de la biomasa, es decir, de organismos vivos o de sus desechos metabólicos<sup>1</sup>.

Los biocombustibles se clasifican en tres grupos generacionales dependiendo de la biomasa de la que parten. Los de primera generación se producen a partir de biomasa vegetal o animal, involucrando los polisacáridos o ácidos grasos presentes en la misma, que podrían eventualmente usarse para la alimentación humana y/o animal. Los biocombustibles de segunda generación son producidos a partir de diferentes materias primas, en especial (aunque no exclusivamente) de biomasa lignocelulósica no comestible. Los biocombustibles de tercera generación están relacionados con la biomasa de algas y con la utilización de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como materia prima<sup>1</sup>. La producción de biocombustibles de primera generación es el área industrial más desarrollada hasta el momento.

El bioetanol es uno de los biocombustibles más utilizados en el continente americano. Los otros biocombustibles, incluyendo el biodiesel, suelen ser comúnmente utilizados en otras regiones como Europa y Asia<sup>1</sup>. Liderados por Brasil y Estados Unidos, la producción mundial de bioetanol se duplicó en un lustro, pasando de 31300 millones de litros (L) en 2005 a más de 85600 millones de L en 2010<sup>2</sup>. En el 2017, la producción de bioetanol alcanzó los 26724 millones L

por parte de Brasil (principalmente a partir de caña de azúcar) y 59809 millones de L por parte de EE. UU. (principalmente a partir de maíz)<sup>3</sup>.

Sin embargo, el rápido crecimiento de la producción de biocombustibles no ha estado exento de controversia. El amplio apoyo por los biocombustibles de primera generación se redujo a medida que algunos estudios destacaron que su producción requería el uso de materias primas que podían tener fines alimenticios<sup>2</sup>, cuestionando su capacidad para desplazar la energía fósil y analizando su potencial contribución al monocultivo y la deforestación<sup>2</sup>.

Desde el punto de vista económico, la producción de etanol a partir de caña de azúcar se encuentra en estrecha competencia con el mercado del azúcar. La materia prima se está volviendo cada vez más costosa, afectando el costo final del bioetanol<sup>2</sup>.

El impacto de estos efectos combinados ha estimulado la producción de biocombustibles producidos a partir de biomasa no alimentaria (segunda o tercera generación), aprovechando el área destinada a otros cultivos y disminuyendo los gastos asociados; incluyendo el riego y los fertilizantes<sup>2</sup>.

## **2.2 Producción de biocombustibles de segunda generación**

La biomasa lignocelulósica utilizada para la producción de biocombustibles de segunda generación suele dividirse en tres categorías: homogénea, como las astillas de madera blanca; cuasi homogénea, como el desecho agrícola y forestal; y no homogénea, incluyendo materia prima de bajo valor como desechos sólidos municipales<sup>4</sup>. El precio de esta biomasa es significativamente menor que el precio del aceite vegetal, el maíz y la caña de azúcar, lo cual es un incentivo para utilizarla como materia prima. A su vez, algunas biomásas, como el maíz, permiten generar una variedad de productos a partir de la misma materia prima, adhiriéndose así al concepto de "biorrefinería"<sup>1</sup>. Dicho concepto abarca una amplia gama de tecnologías capaces de separar los recursos de biomasa (madera, pastos, maíz, etc.) en sus componentes básicos (carbohidratos, proteínas, triglicéridos entre otros) que pueden convertirse en una gran variedad de productos y energía comercializables, es decir, productos con valor agregado, biocombustibles y productos químicos<sup>5</sup>.

Se investigan numerosas estrategias para producir biocombustibles de segunda generación, pero en general se basan en dos vías: termoquímica o bioquímica. La primera consiste en un tratamiento térmico de la biomasa a una concentración baja o ausente de un agente oxidante. Los procesos de esta categoría conducen a la conversión de biomasa en tres fracciones: un sólido conocido como biocarbón, un líquido denominado aceite pirolítico o bio-aceite, y un gas conocido como gas de síntesis, que generalmente está compuesto de monóxido de carbono (CO), hidrógeno (H<sub>2</sub>), alcanos de cadena corta y CO<sub>2</sub>. Cuando se procesa sin oxígeno (O<sub>2</sub>) a bajas temperaturas (250 a 350°C), la biomasa se somete a un proceso de torrefacción y el principal producto de conversión es el biocarbón. A mayores temperaturas (550 a 750°C), también sin O<sub>2</sub>, el proceso se conoce como pirólisis y el principal producto es el bio-aceite. A temperaturas más altas (750 a 1200°C) y con entradas de O<sub>2</sub> limitadas, se produce gasificación, siendo el producto principal el gas de síntesis (con bio-carbón y bio-aceites como subproductos). La vía bioquímica se basa en el uso de microorganismos, generalmente levaduras, para la conversión de biomasa en biocombustibles. Para que el proceso sea eficiente y económico, el enfoque bioquímico requiere la utilización completa del contenido de carbono de la biomasa lignocelulósica, transformando así al procesamiento de la biomasa, y a las tecnologías utilizadas para el mismo, en una "biorrefinería" capaz de producir una amplia gama de biocombustibles y productos químicos<sup>1</sup>.

La **biomasa lignocelulósica**, utilizada para la producción de biocombustibles de segunda generación, consta de tres unidades estructurales principales: celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa es un biopolímero de monómeros de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1-4-O-glucosídicos. La hemicelulosa se compone por heteropolisacáridos formados por diversos monómeros, incluyendo principalmente xilosa, glucosa, arabinosa y galactosa. Por último, la lignina está constituida por polímeros complejos, incluyendo compuestos poli-aromáticos que muchas veces resultan tóxicos y de difícil degradación.

La conversión de biomasa lignocelulósica en alcohol requiere de un proceso de cuatro pasos: un pretratamiento de la biomasa, una etapa de hidrólisis ácida o enzimática, una etapa de fermentación y por último la etapa de destilación<sup>6</sup>. La hidrólisis de la biomasa lignocelulósica genera, además de una mezcla de pentosas

y hexosas, compuestos inhibidores, como por ejemplo, furfural, fenoles, ácido acético y disolventes tóxicos producidos durante el pretratamiento; los cuales dificultan la etapa de fermentación microbiana<sup>7</sup>.

Las **hemicelulosas** representan entre el 15 y 25% del peso seco de la biomasa lignocelulósica y su composición depende del vegetal de donde proviene. La principal ventaja de las mismas es que, debido a su estructura altamente ramificada, pueden hidrolizarse fácilmente<sup>1</sup>. Como se mencionó anteriormente, está compuesta por polímeros altamente ramificados de carbohidratos de 5 y 6 carbonos. Dichos polímeros, se clasifican según la composición de su cadena principal en: xilanos, xiloglucanos, glucanos, mananos, glucomanos, etc<sup>8</sup>. Los xilanos están constituidos por una cadena lineal de residuos de xilosa con diversas ramificaciones y sustituciones (arabinosa, glucosa, galactosa y glucuronato)<sup>8</sup>. La xilosa es el azúcar más abundante de la hemicelulosa y el segundo, luego de la glucosa, en la biomasa lignocelulósica.

### **2.3 Producción de bioetanol**

A nivel industrial, el bioetanol generalmente se produce por la fermentación de azúcares de 6 carbonos, utilizando cepas salvajes seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>1</sup>.

Las levaduras utilizadas en la producción industrial de etanol emplean la glucólisis para degradar la glucosa y producir etanol a partir de los intermediarios generados en este proceso metabólico. Dicho proceso convierte la glucosa en un producto parcialmente oxidado, el piruvato, al mismo tiempo que suministra ATP para la producción de biomasa. Posteriormente, en condiciones anaerobias, el piruvato puede fermentarse generando varios productos, entre ellos el etanol. Este proceso ocurre mediante reacciones secuenciales de la piruvato descarboxilasa (PDC) y la alcohol deshidrogenasa (ADH), en las cuales el piruvato pierde un carbono en forma de CO<sub>2</sub><sup>9</sup>. Las cepas industriales de *S. cerevisiae*, tienen varias ventajas, incluyendo una alta productividad de etanol a partir de hexosas, una gran tolerancia a altas concentraciones del producto de fermentación<sup>10</sup> y además, una respuesta al estrés osmótico (provocado por un medio hipertónico) a través de la producción y acumulación de glicerol intracelular (para contrarrestar la

concentración de soluto exterior)<sup>11</sup>. Sin embargo, las pentosas no son metabolizadas por las cepas nativas de *S. cerevisiae*<sup>12</sup>.

Se han desarrollado múltiples estrategias con el objetivo de aprovechar todos los azúcares fermentables contenidos en la biomasa lignocelulósica. Estas incluyen la bio-prospección de nuevos organismos capaces de consumir hexosas y pentosas y el desarrollo de técnicas de ingeniería metabólica e ingeniería genética de algunas cepas de *S. cerevisiae*<sup>13</sup>. La modificación de cepas industriales de *S. cerevisiae* intenta aprovechar las instalaciones industriales ya disponibles, además de las ventajas de la levadura mencionadas previamente. Cabe agregar que al disponer de la secuencia del genoma (12 Mb) de *S. cerevisiae*, estos organismos son modelos ideales para la investigación básica y aplicada<sup>14</sup>.

El diseño de cepas recombinantes de *S. cerevisiae* capaces de metabolizar eficientemente xilosa ha sido desarrollado considerando distintos pasos limitantes<sup>14</sup>. Las estrategias utilizadas pueden resumirse de la siguiente manera: (1) identificación y expresión de enzimas con mejores actividades catalíticas en la levadura; (2) control de flujo de intermediarios y precursores; (3) eliminación de vías competitivas; (4) equilibrio redox y regeneración de cofactores; y (5) modificación de los mecanismos reguladores<sup>9</sup>.

## **2.4 Transporte y metabolismo de xilosa en *S. cerevisiae***

### **2.4.1 Permeasas**

Uno de los problemas claves en el metabolismo de xilosa es la ausencia de un transportador de xilosa de alta afinidad. Principalmente se han empleado dos estrategias: inserción de transportadores de xilosa heterólogos o ingeniería genética sobre los transportadores presentes en *S. cerevisiae*<sup>15</sup>. Esta levadura contiene 18 genes identificados como codificadores de permeasas implicadas en el transporte de hexosas (Hxt1-17 y Gal2). Dichas permeasas tienen diferentes funciones durante la fermentación alcohólica. Por ejemplo, Hxt-2 está involucrado en la etapa inicial de crecimiento y Hxt-6 y/o Hxt-7 son requeridos en la etapa final de la fermentación alcohólica<sup>16</sup>. Las permeasas Hxt1, Hxt4, Hxt5, Hxt7 y Gal2 pueden transportar xilosa, pero sus afinidades son 200 veces menores en comparación con las determinadas para glucosa<sup>17</sup>. Sin embargo, se ha logrado

modificar los genes de transporte endógenos de *S. cerevisiae*, obteniendo cepas con mejor capacidad para transportar xilosa<sup>14</sup>. Farwick y col. (2014) analizaron una colección de mutantes en los genes de transporte Gal2 y Hxt7<sup>18</sup>. La sustitución del codón de asparagina en la posición 376 por el de fenilalanina en el gen Gal2 (Gal2-N376F) fue la modificación más efectiva, ya que eliminó la actividad de transporte de glucosa, obteniendo una única afinidad por D-xilosa<sup>18</sup>.

Por otro lado, Weierstall y col. (1999) describieron la presencia de tres transportadores de azúcar en *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*): Sut1, Sut2 y Sut3<sup>19</sup>. Aunque los tres transportadores tienen mayor afinidad por glucosa que por xilosa, el transportador Sut1 tiene mayor velocidad máxima de transporte de xilosa en comparación con la de los otros dos transportadores (Sut1  $V_{\max}$  132  $\pm$  1,0 unid, Sut2  $V_{\max}$  41  $\pm$  1,0 y Sut3  $V_{\max}$  87  $\pm$  2,0). A partir de estos datos, Katahira y col. (2007) introdujeron el gen Sut1 de *S. stipitis* en una cepa recombinante de *S. cerevisiae* capaz de asimilar xilosa, e investigaron las propiedades de fermentación de la cepa utilizando como fuente de carbono xilosa, glucosa o una mezcla de ambas<sup>20</sup>. La expresión de Sut1 en la cepa recombinante de *S. cerevisiae* aumentó la actividad de transporte y la productividad de etanol durante la fermentación de xilosa. Además, la actividad de transporte de glucosa y la productividad de etanol durante la fermentación de glucosa también aumentaron al expresar Sut1. El rendimiento de etanol durante la co-fermentación de xilosa y glucosa de la cepa que expresa Sut1 (0,44 g/g de azúcar consumido) fue significativamente mayor que el de la cepa salvaje (0,39 g/g de azúcar consumido). Estos rendimientos fueron determinados a partir de cultivos de ambas cepas incubados por 24 hs en un medio que contenía 50 g/L tanto de xilosa como de glucosa<sup>21</sup>.

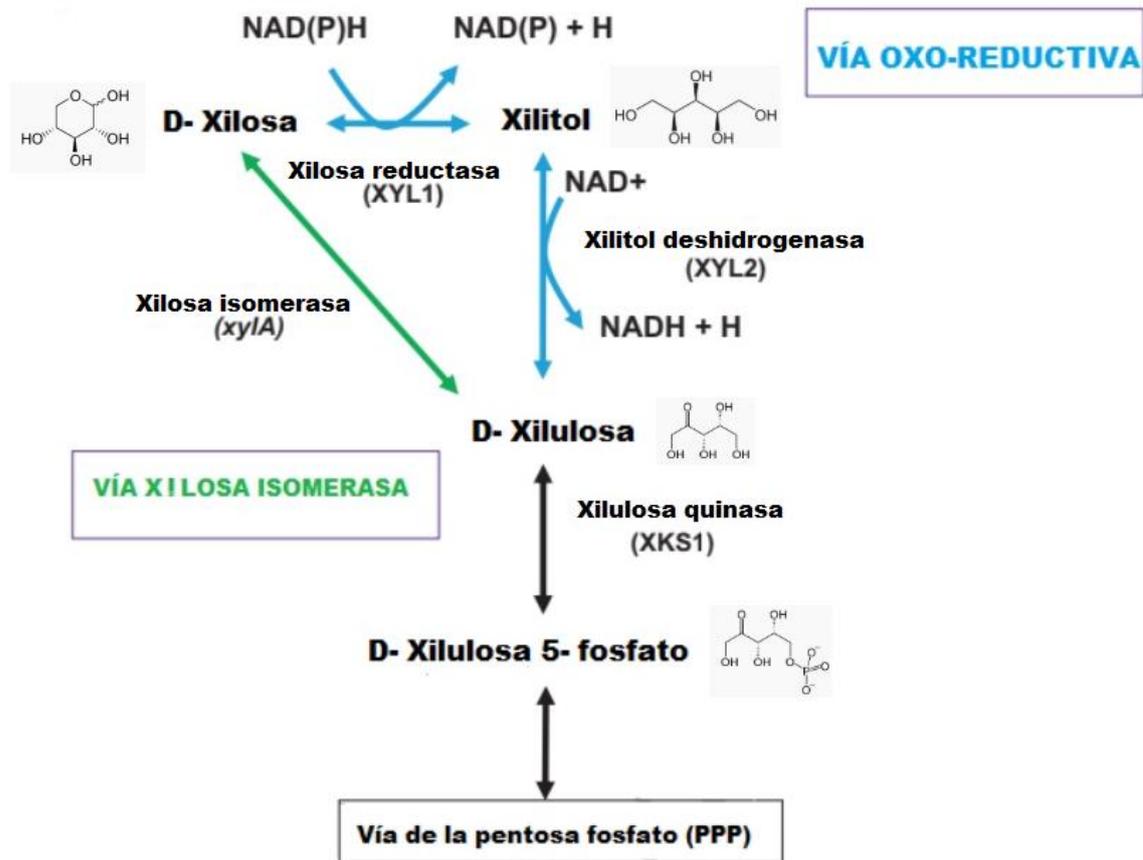
Hector y col. (2008) diseñaron cepas recombinantes de *S. cerevisiae* capaces de producir etanol a partir de xilosa por expresión de la vía oxo-reductiva (se explica más adelante). Dichas cepas contenían dos transportadores heterólogos At5g59250 y At5g17010 (uno por cepa) de *Arabidopsis thaliana*, que codifican para transportadores de xilosa. Los ensayos de producción en un medio que contenía 20 g/L de glucosa y 50 g/L de xilosa inicial, les permitieron alcanzar rendimientos de etanol de 0,23 g/g de azúcar consumido por parte de la cepa parental (cepa con la vía oxo-reductiva sin transportador de xilosa agregado) y

0,26 g/g de azúcar consumido en las dos cepas modificadas con los genes de transporte heterólogos, At5g59250 y At5g17010<sup>22</sup>.

#### **2.4.2 Vías metabólicas para la asimilación de xilosa**

Se han identificado diferentes vías metabólicas para asimilar xilosa. Por un lado están las rutas Weimberg<sup>23</sup> y Dahms<sup>24</sup> que se encuentran en algunas bacterias y arqueas; y son independientes de la ruta de la pentosa fosfato (PPP). Ambas rutas forman el intermediario 2-keto-3-deoxi-xilonato a través de una xilosa deshidrogenasa y otras enzimas, que luego puede convertirse en  $\alpha$ -cetoglutarato por la vía Weimberg o en piruvato y glicolaldehído por la ruta Dahms<sup>25</sup>.

Por otro lado, para ingresar en el metabolismo central del carbono, la xilosa también puede convertirse primero en xilulosa-5-fosfato, un compuesto intermediario de la ruta PPP. Básicamente, se han descrito dos vías diferentes para la conversión de pento-aldosas a xilulosa: rutas basadas en reacciones de reducción/oxidación y vías basadas en la isomerización. En las levaduras, hongos filamentosos y otros eucariotas<sup>26</sup> que crecen utilizando pentosas como fuente de carbono, la xilosa se reduce primero mediante la xilosa reductasa (XR) a xilitol<sup>27</sup>, que a su vez se oxida a xilulosa por la xilitol deshidrogenasa (XDH). Esta vía es conocida como vía oxo-reductiva<sup>28</sup>. En bacterias y algunos hongos anaerobios, la xilosa isomerasa (XI) es responsable de la conversión directa de xilosa a xilulosa. Luego, en ambas vías, la xilulosa se fosforila finalmente a xilulosa-5 fosfato por la xiluloquinasa (XK)<sup>27</sup>(Figura 1).



**Figura 1** Vía de la xilosa isomerasa y vía oxo-reductiva. Figura extraída y modificada de **Malan y col., (2016)**. La reacción específica para la vía de la xilosa isomerasa se muestra en verde y las reacciones específicas para la ruta oxo-reductiva en azul. Las reacciones compartidas se muestran en negro. A los costados de cada compuesto intermediario se detallan las estructuras químicas de los mismos. Entre paréntesis debajo de cada enzima, se muestra el nombre del gen que codifica para cada una.

Los estudios sobre producción de bioetanol a partir de xilosa por *S. cerevisiae* se han centrado en estas dos vías expresadas de forma heteróloga. La expresión heteróloga de los genes que codifican para la vía oxo-reductiva (XR/XDH) de *S. stipitis*<sup>29</sup> y la ruta XI (gen *xyIA*) de *Piromyces* sp. han sido las estrategias más comúnmente empleadas<sup>30</sup>.

A pesar de tener todas las enzimas de la vía oxo-reductiva, *S. cerevisiae* no puede asimilar xilosa y producir etanol, produciendo principalmente xilitol<sup>31</sup>. Esta incapacidad se debe a un desbalance redox en los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) durante la conversión de xilosa a etanol<sup>32</sup>. El gen GRE3 codifica para una reductasa que sintetiza xilitol a partir de D-xilosa y utiliza principalmente nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como cofactor.

Este gen es inducible por xilosa. Por otro lado, el gen XDH codifica para la xilitol deshidrogenasa, la cual utiliza preferentemente  $\text{NAD}^+$ <sup>26</sup>. El NADPH requerido en el primer paso se genera en la ruta de hexosa mono-fosfato (HMP) por la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa<sup>32</sup>. El problema es que, bajo estas condiciones de crecimiento, no habría una fuente renovable de  $\text{NAD}^+$  en *S. cerevisiae*. El NADH podría reoxidizarse mediante la formación de glicerol<sup>32</sup>. Sin embargo, la fermentación de xilosa en etanol requeriría la conversión de una molécula de triosa fosfato a glicerol por cada molécula de xilosa metabolizada. La cuestión es que no se puede metabolizar suficiente triosa fosfato para producir etanol, dando como resultado una escasez de ATP. En cambio, si las dos enzimas (XR y XDH) utilizaran el mismo cofactor, por ejemplo NADH, teóricamente se daría una retroalimentación positiva, en la cual el NADH oxidado en una reacción sería reducido en la siguiente.

Además, la sobreexpresión de la xilulosa quinasa o de algunas enzimas de PPP como la transaldolasa (TAL1), transquetolasa (TKL1), L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa (RPE1) y ribosa-5-fosfato isomerasa (RKI1) de *S. cerevisiae*, puede mejorar significativamente la producción de etanol<sup>33</sup>.

#### **2.4.2.1 Vía Xilosa Isomerasa**

La formación de xilitol y el desbalance redox pueden evitarse expresando la vía de la xilosa isomerasa (XI) en lugar de la vía XR-XDH. La expresión heteróloga y funcional de la enzima xilosa isomerasa en *S. cerevisiae* requirió 16 años de investigación<sup>34</sup>. Los genes de la ruta XI se distribuyen principalmente en los genomas bacterianos. Por consiguiente, los intentos iniciales para introducir la vía XI en *S. cerevisiae* emplearon genes de este origen. Sin embargo, la mayoría de ellos no tuvieron éxito debido a la dificultad para expresar una enzima bacteriana funcional en este organismo eucariota<sup>15</sup>. De hecho, se intentaron expresar sin resultado los genes XI de *Escherichia coli*<sup>35</sup>, *Bacillus subtilis*<sup>36</sup> y *Clostridium thermosulfurogenes*<sup>37</sup> en *S. cerevisiae*. El resultado negativo se fundamentó por la incapacidad de la levadura de expresar *xyIA* o de sintetizar la enzima activa<sup>38</sup>. El primer intento exitoso se realizó con el gen *xyIA* de la bacteria termófila *Thermus thermophilus* en una cepa de *S. cerevisiae* (H158(pMA91)), la cual fue capaz de producir 1,3 g/L de etanol con un consumo de 10,4 g/L de xilosa<sup>39</sup>.

Además, se ha demostrado que la optimización de codones mejora el rendimiento de las vías heterólogas de xilosa isomerasa en *S. cerevisiae*, logrando un aumento significativo en el rendimiento y la productividad del etanol<sup>27</sup>. Por otro lado, la evolución dirigida también es una estrategia efectiva para mejorar las propiedades cinéticas de XI en *S. cerevisiae*<sup>15</sup>.

Cuando se combinó la expresión XI de *Piromyces* sp. (eucariota del reino Fungi) en plásmidos de copias múltiples con extensos protocolos de evolución, se obtuvo una cepa de *S. cerevisiae* recombinante (RWB202-AFX) fermentadora de xilosa y capaz de producir 8,4 g/L de etanol, con un consumo de 20 g/L de xilosa aproximadamente<sup>40</sup>. Esta cepa superó ampliamente (en cuanto a producción de etanol) a la cepa H158(pMA91) que contenía el gen *xylA* de la bacteria termófila *T. thermophilus*.

#### **2.4.2.2 Vía oxo-reductiva**

La especificidad de la enzima XR de *S. stipitis* por su cofactor puede modificarse parcialmente, sustituyendo la lisina en la posición 270 por otros aminoácidos, como la arginina o la metionina, sorteando el problema del desbalance redox<sup>41</sup>. En un estudio reciente, una cepa recombinante de *S. cerevisiae*, TMB 3057, con los genes XR (modificado)-XDH de *S. stipitis*, mostró una tasa de consumo de xilosa y una productividad de etanol significativamente mayor en comparación con una cepa isogénica TMB 3066 portadora de la vía XI de *Piromyces* sp.<sup>42</sup>. La cepa con los genes XR-XDH de *S. stipitis* presentó una tasa de consumo de xilosa de  $39,6 \pm 3,4$  g/L en 100 horas mientras que la cepa isogénica portadora de la vía XI de *Piromyces* sp. alcanzó  $16,8 \pm 3,8$  g/L en 100 horas (h). Por otro lado, la productividad celular de etanol para la primera cepa fue de  $0,04 \pm 0,01$  g de etanol/g de células\*h mientras que para la segunda fue de  $0,02 \pm 0,01$ , generando  $13,3 \pm 1,7$  g/L y  $7,3 \pm 2,1$  de etanol, respectivamente<sup>42</sup>. Sin embargo, el rendimiento de etanol de la cepa TMB 3066 fue mayor que el de la cepa TMB 3057 (Tabla 1, página 16 y 17).

## **2.5 Estadísticas, cepas y actualidad**

### **2.5.1 Avances políticos y estadísticas sobre la producción de etanol**

Desde el 2007, en Uruguay, se creó la ley N° 18.195 la cual tiene por objetivo fomentar y regular la producción, la comercialización y la utilización de agrocombustibles. Asimismo, tiene por objeto reducir las emisiones de gases de efecto invernadero en los términos del Protocolo de Kyoto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, aprobados por la Ley N° 17.279, de 23 de noviembre de 2000, contribuyendo al desarrollo sostenible del país. En esta ley se propuso la utilización obligatoria de mezclas de biocombustible con gasolina, en un 5% del total. En febrero de 2016 realizaron una modificación de la ley en cuanto al porcentaje de mezcla obligatorio proponiendo que: si el costo de producción en el país del alcohol carburante es inferior al costo de producción de las naftas (gasolinas), la proporción será de hasta un 10% sobre el volumen total de la mezcla entre dicho producto y las naftas. Por otro lado, si el costo de producción en el país de alcohol carburante es superior en hasta un 20% al costo de producción de las naftas (gasolinas), la proporción será de hasta un 5% sobre el volumen total de la mezcla entre dicho producto y las naftas. Y por último, si el referido costo de producción es superior en más de un 20% al costo de producción de las naftas (gasolinas), la proporción será hasta un 2,5%.

En Uruguay la única empresa que produce bioetanol es ALUR (Alcoholes del Uruguay). La misma posee dos complejos agroindustriales en Paysandú y Bella Unión, con una capacidad de producción anual de 102 millones de litros de bioetanol (ALUR, 2015). Las materias primas que utilizan son sorgo BT y caña de azúcar. El bioetanol producido es suministrado a ANCAP para la mezcla en las naftas y además es exportado al mercado chileno (ALUR, <http://www.alur.com.uy/productos/biocombustibles.php>).

En 2017 se informó que en Eurasia había aumentado el consumo de bioetanol y se esperaba que esta tendencia de aumento se mantuviera durante el corriente año<sup>43</sup>. La misma se debe principalmente al aumento del porcentaje de adición de biocombustibles a los combustibles fósiles, dictado por el mandato de la Unión Europea 2020 y a la mejora de la competitividad de la producción de bioetanol frente a la gasolina<sup>43</sup>.

Recientemente, Colombia aumentó su mandato de mezcla de biocombustibles al 10%. El aumento tiene como objetivo abordar los problemas de contaminación en las grandes ciudades metropolitanas, alcanzar los compromisos de Colombia en materia de cambio climático asumidos en el marco del Acuerdo Climático de París 2015 COP21 e incentivar la producción local. La producción de etanol en Colombia se deriva completamente de la caña de azúcar, desplazando cerca del 40% de las exportaciones de azúcar del país<sup>44</sup>.

En contraste, el desarrollo del sector de biocombustibles sigue teniendo una baja prioridad para el gobierno ruso. Sin embargo, Rusia es el principal productor de biomasa en el sector de chips (*pellets*) de madera y sigue siendo un actor global importante. La publicación pronostica que las exportaciones de *pellets* de madera aumentarán pero a un ritmo moderado del 4% en el 2018. Este aumento se atribuye a la fuerte demanda de la Unión Europea y nuevos mercados de producción de biocombustibles en Japón y China<sup>45</sup>.

### **2.5.2 Producción de etanol de segunda generación a nivel industrial**

No existen muchos datos sobre la producción industrial de biocombustibles de segunda generación a nivel mundial. Se hallaron tres notas periodísticas, las cuales afirman que la producción de etanol de segunda generación se establecerá en Brasil para el año 2025<sup>46-48</sup>; las simulaciones para estimar dicho plazo se realizaron sobre la base de diferentes escenarios tecnológicos a corto plazo (de 2015 a 2020), a medio plazo (de 2021 a 2025) y a largo plazo (de 2026 a 2030).

En las notas se abarcan temáticas económicas en las cuales se afirma que en Brasil, para el año 2025, el costo de producción del etanol celulósico será igual al de primera generación (R\$ 0,75 por litro) y que a partir de 2030 será más barato aún (R\$ 0,52 por litro). Esto sucederá siempre y cuando se superen los obstáculos agrícolas, industriales y tecnológicos actuales<sup>46-48</sup>.

En el área agrícola, uno de los obstáculos para la producción de etanol de primera y segunda generación como un biocombustible económicamente viable, es el alto costo de la biomasa. Otro obstáculo es la falta de un sistema agrícola e industrial diseñado para hacer un uso integral de la caña de azúcar. Además, la producción debe prever otras alternativas de cultivo (además de la caña de azúcar) para que la

planta industrial pueda operar en períodos de temporada baja; llegando así a un trabajo constante de 300 a 330 días al año contra la actual media anual de 200 a 240 días<sup>46-48</sup>.

En el área tecnológica uno de los principales problemas es el pretratamiento de la biomasa. En dicha etapa, la celulosa y la hemicelulosa se procesan para recuperar los azúcares fermentables. El pretratamiento del material lignocelulósico todavía está en desarrollo y los equipos necesarios para realizarlo son muy costosos. Otro problema es que se requieren tiempos prolongados para la etapa de hidrólisis. Esto implica aumentar el costo de almacenamiento en tanques y mayor riesgo de contaminación. De esta manera, la capacidad de producción de las plantas industriales de etanol de segunda generación debe ser a gran escala, para poder compensar las pérdidas que puedan ocurrir por eventuales contaminaciones en el proceso. Un tercer problema tecnológico está relacionado con el proceso de fermentación de las pentosas. La producción a partir del hidrolizado de hemicelulosa todavía está en desarrollo, y según el propio CTBE, se acaba de diseñar una levadura modificada capaz de producir etanol a partir de las pentosas, aunque estos datos aún no están disponibles<sup>46-48</sup>.

Las dos plantas de etanol de segunda generación existentes en Brasil adoptaron diferentes rutas tecnológicas. GranBio se basó en una ruta tecnológica llamada “*stand alone*”, caracterizada por una planta industrial dedicada exclusivamente a la producción de etanol de segunda generación, sin integrarse a otra de primera generación. Por otro lado, Raízen (*jointventure* entre Shell y Cosan) optó por construir una planta integrada. Una ventaja del proceso tecnológico adoptado por Raízen es la posibilidad de fermentar el hidrolizado de celulosa junto con la sacarosa, para obtener etanol proveniente de azúcares de 6C, mientras que las pentosas pueden ser fermentadas aisladamente. Las dos plantas han enfrentado desafíos tecnológicos para producir el etanol de segunda generación, principalmente en la fase de pretratamiento del material, resultando, en niveles reducidos de producción<sup>46-48</sup>.

### **2.5.3 Cepas recombinantes creadas hasta la fecha y rendimiento de etanol**

En la Tabla 1 se representan algunas de las cepas recombinantes creadas hasta la fecha en las cuales se especifica la vía de fermentación utilizada, las modificaciones

genéticas empleadas, las condiciones de cultivo y el rendimiento de etanol (g etanol/g de xilosa consumido) en cada caso. Para analizar estos datos es importante tener en cuenta que, teóricamente, el máximo rendimiento de etanol a partir de xilosa para la vía oxo-reductiva es de 0,46 g/g<sup>49</sup> y para la vía de la xilosa isomerasa es de 0.51 g/g<sup>50</sup>. Esta diferencia es debido a que, en teoría, no es necesaria la producción de ningún subproducto para compensar el desequilibrio redox.

**Tabla 1 Cepas recombinantes de *S. cerevisiae*.**

Cepa de <i>S.cerevisiae</i>	Vía de fermentación		Modificaciones genéticas	Condiciones de cultivo	Y <sub>g etanol / g de xilosa consumido</sub>	Referencia
	XR-XDH	XI				
TMB 3066	-	Origen <i>Piromyces</i> sp. en plásmido	TMB 3044, YEpHXT-XIp (HXT7p-XI-PGK1t URA3)	50 h, 100 g/L xilosa	0,43±0,03	42
TMB 3057	Origen <i>S. stipitis</i> en plásmido	-	TMB 3044, pY7 (ADH1p-XYL1-ADH2t, PGK1p-XYL2-PGK1t URA3)	50 h, 100 g/L xilosa	0,33±0,02	42
TMB 3400	Origen <i>S. stipitis</i> inserto en el genoma	-	ADH1p-XYL1-ADH2t, PGK1p-XYL2-PGK1t, PGK1p-XKS1-PGK	50 h, 100 g/L xilosa	0,34±0,03	42

RWB202-AFX	-	Origen <i>Piromyces</i> sp. en plásmido o muticopia	CEN.PK113-5D, ura3, pAXK002 (pTPI1 <i>xylA</i> , tCYC1).	120 h, 20 g/L xilosa	0,42±0.00	40
H158(pMA9)	-	Origen <i>T. thermophilus</i> en plásmido	H158 [GPY55-15B (MATa leu2-3 leu2-112 ura3-52 trp1-289 his4-519 prb1 cir1)] pUC19-XI, pMA91.	110 h, 30 g/L xilosa	0,125	39
BY4741X	Origen <i>S. stipitis</i> inserto en el genoma	-	XYL1 y XYL2 de <i>S. stipitis</i> y XKS1 de <i>S. cerevisiae</i>	72 h, 80 g/L de xilosa	0,279	51
BY4741X/ΔP HO13	BY4741X con depleción de PHO13	-		72 h, 80 g/L de xilosa	0,357	51

Se puede observar que las cepas con mayor rendimiento de etanol son aquellas que contienen un plásmido con el gen *xylA* de *Piromyces* sp.

PHO13<sup>15</sup> es una fosfatasa que según lo reportado por Kwak y Jin (2017) su depleción incrementa la producción de etanol.

## 2.6 Antecedentes del proyecto: cepas de estudio

Este estudio se focalizó en la cepa diploide de *S. cerevisiae* CAT-1<sup>52</sup>, comercializada por Fermentec y ampliamente utilizada a nivel industrial en Brasil y Uruguay para la producción de etanol. En nuestro país es utilizada por la empresa Alcoholes del Uruguay (ALUR). La cepa CAT-1 fue previamente modificada en nuestro laboratorio, para expresar las dos vías de catabolismo de xilosa: oxo-reductiva (XR / XDH) y la vía de la xilosa isomerasa (XI).

De este modo se construyeron dos cepas recombinantes derivadas de *S. cerevisiae* CAT-1: CAT-1-XRT y CAT-1-XIT, obtenidas por inserción, a nivel cromosomal, de genes involucrados en la asimilación y transporte de xilosa. Se insertó en cada alelo del gen GRE3 (que codifica para la xilosa reductasa de *S. cerevisiae*), uno de los bloques detallados en la Figura 2, generando así la eliminación del gen. Todos los bloques de genes están flanqueados por 300 nucleótidos idénticos a alguna parte del gen GRE3, lo que permitió la inserción de los bloques por recombinación homóloga a partir de ADN lineal. Además todos los bloques contienen un gen de resistencia a antibiótico flanqueado por regiones *lox*, lo que permitió la selección de los recombinantes y posterior eliminación de los genes de resistencia.

La cepa CAT-1-XRT contiene dos bloques, el bloque 1<sub>vía oxo-reductiva</sub> en un alelo GRE3 (Figura 2A) y el bloque 2 en el otro alelo (Figura 2B).

El bloque 1 contiene las regiones codificantes de los genes XR (XYL1 K270R)<sup>41</sup> y XDH (XYL2) de *S. stipitis* y la región que codifica para gen XK (XKS1) de *S. cerevisiae*. El gen XYL1 posee una mutación puntual en la posición 270 que genera la sustitución de una lisina por una arginina, la cual aumenta la especificidad de la enzima para la utilización del cofactor NAD<sup>+41</sup>.

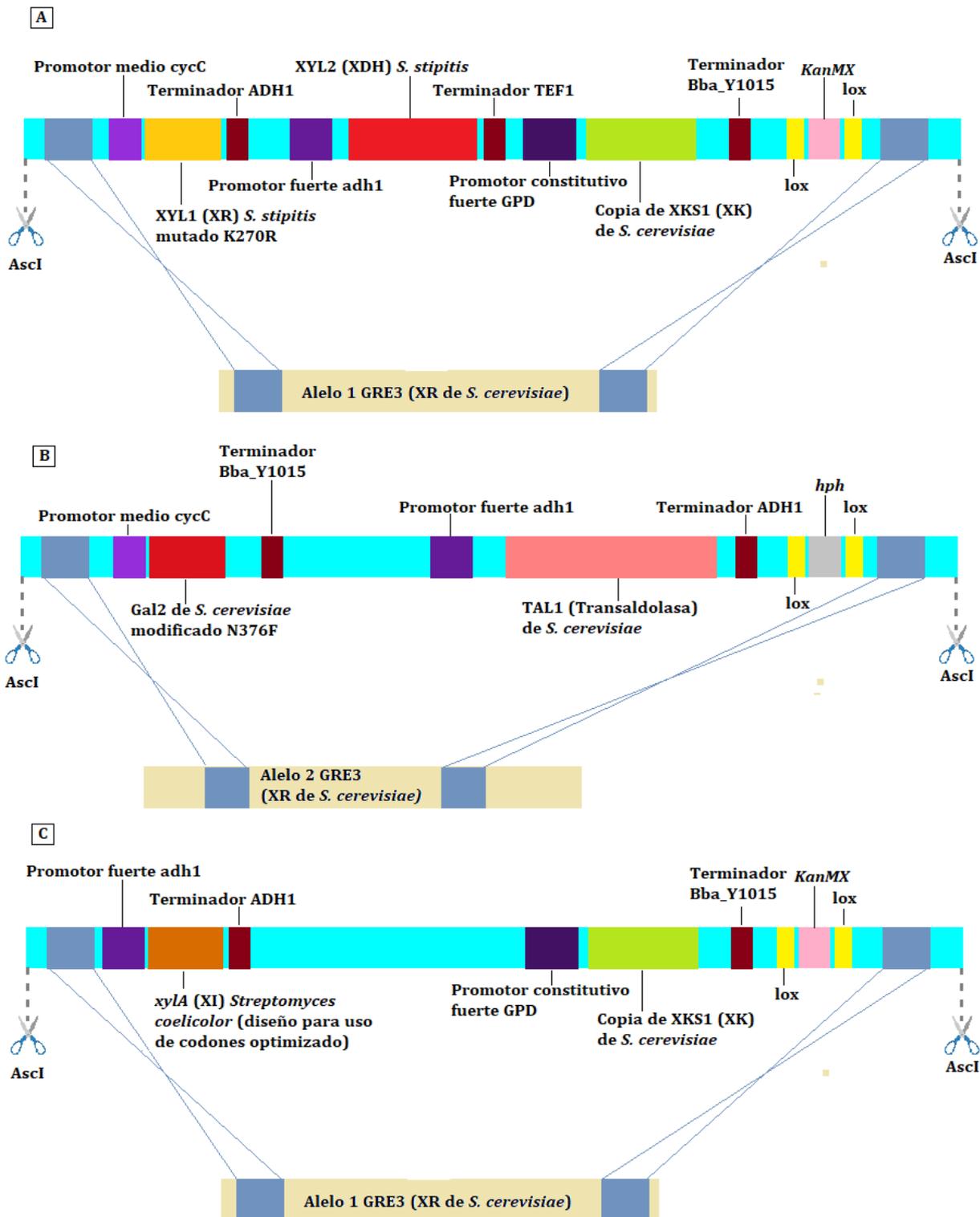
El bloque 2 se compone de la región codificante del gen Gal2 (transportador mutado en N376F<sup>18</sup>) y el ORF TAL1, uno de los genes de la vía PPP de *S. cerevisiae* que codifica para una transaldolasa. Este bloque se encuentra flanqueado por regiones idénticas a parte del gen GRE3 de la levadura y se insertó luego del bloque

1. Las regiones GRE3 del bloque 2 recombinan en una zona interna a la que reconoce el bloque 1, evitando así la depleción de éste último.

La cepa CAT-1-XIT también se compone de dos bloques, el bloque 3<sub>vía xilosa isomerasa</sub> (Figura 2C) y el bloque 2 (también presente en la cepa CAT-1-XRT) (Figura 2B).

El bloque 3<sub>vía xilosa isomerasa</sub> contiene el ORF del gen heterólogo *xylA* (XI) de *Streptomyces coelicolor* (con uso de codones optimizado para la levadura), y el ORF del gen propio XKS1 (Figura 2C). En este caso el bloque 3 se insertó primero y luego el bloque 2.

Las secuencias de los genes heterólogos (XR, XDH y *xylA*) fueron extraídas de la base de datos GenBank, y posteriormente optimizadas para el uso de codones de *S. cerevisiae*.



**Figura 2** Bloques con genes en tándem insertos en los alelos GRE3 de las cepas CAT-1 mutantes. (A) Bloque 1 vía oxo-reductiva presente en un alelo de la cepa CAT-1-XRT. (B) Bloque 2, compartido por las cepas CAT-1-XRT y CAT-1-XIT. (C) Bloque 3 vía xilosa isomerasa presente en un alelo de la cepa CAT-1-XIT.

Estos bloques fueron sintetizados por la empresa GeneCust (Luxemburgo) y la optimización de codones estuvo a cargo de la misma. Los promotores utilizados en cada gen fueron elegidos específicamente (Figura 2).

Las regiones codificantes de los genes XKS1 y TAL1 provenientes de *S. cerevisiae* S288c, el gen *kanMX* de resistencia a Geneticin (G418) contenido en el plásmido pUG6<sup>53</sup> y el gen *hph* de resistencia a higromicina contenido en el plásmido pUG75<sup>54</sup> se amplificaron por PCR y se clonaron dentro de los bloques en sitios de restricción especialmente diseñados para tal propósito. Una vez insertados estos genes, los bloques quedaron completos. Los bloques 1<sub>vía oxo-reductiva</sub> o 3<sub>vía xilosa isomerasa</sub> (dependiendo de la cepa a construir) se integraron en primer lugar. Las recombinantes se seleccionaron por resistencia a G418. En una segunda instancia, se transformó con el bloque 2 que tiene el gen de resistencia a higromicina. Como resultado, los clones transformantes se seleccionaron por ser simultáneamente resistentes a G418 y a higromicina.

Una vez seleccionadas las cepas recombinantes, se extrajeron los genes de resistencia a antibióticos empleando este sistema Cre/lox. Cada gen de resistencia de cada bloque se encontraba flanqueado por regiones *lox*. Estas secuencias son dos repeticiones directas de 34 pb, las cuales son reconocidas por la recombinasa sitio específica Cre<sup>55</sup>. Para ello, se incorporó el plásmido pSH66 que porta el gen Cre, bajo el control del promotor GAL1 inducible por galactosa<sup>54</sup>. La expresión de Cre se indujo incubando las levaduras en un medio que contenía galactosa<sup>55</sup> y se verificó la pérdida de la resistencia a los antibióticos y del plásmido.

Estas cepas no lograron crecer en xilosa de forma apreciable, aún después de los ensayos de evolución. Estimando que el fenotipo obtenido se debe a la baja o nula expresión de los genes heterólogos incorporados, en este trabajo nos centraremos en la vía XI construyendo un plásmido de alto número de copias (pRS42K::XI) con el gen *xylA* de *Piromyces* sp. precedido por el promotor fuerte pTPI1 y seguido por el terminador tCYC1. Este plásmido se transfirió a las cepas CAT-1, CAT-1-XRT y CAT-1-XIT para evaluar el fenotipo final.

### 3 HIPÓTESIS

---

Las cepas recombinantes CAT-1-XRT no crecen en xilosa debido a la baja expresión de la vía oxo-reductiva heteróloga. Por otro lado, las cepas recombinantes CAT-1-XIT no crecen debido a la nula expresión del gen heterólogo que codifica a la enzima XI de *Streptomyces coelicolor* (bacteria). La incorporación en estas cepas del gen *xylA* de *Piromyces* sp. (que codifica para XI) bajo el control de un promotor fuerte en un plásmido de alto número de copias, resultará en cepas que sean capaces de transformar la xilosa en etanol a través de la ruta de la xilosa isomerasa.

### 4 OBJETIVO GENERAL

---

Construir cepas modificadas de *S. cerevisiae* capaces de producir etanol como producto mayoritario de la fermentación de xilosa a través de la vía de isomerización mediante XI.

#### 4.1 Objetivos específicos

Construir un plásmido capaz de replicarse en *S. cerevisiae* en alto número de copias, derivado de pRS42K<sup>29</sup>, que contenga el gen *xylA* de *Piromyces* sp. y transferirlo a las cepas CAT-1, CAT-1-XRT y CAT-1-XIT.

Realizar una evolución dirigida a la producción de etanol presionando a las cepas obtenidas en este trabajo a crecer en condiciones de limitación parcial de oxígeno, utilizando xilosa como fuente de carbono.

Comparar el rendimiento de producción de etanol y consumo de xilosa de las distintas cepas.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 5.1 Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento

En la Tabla 2 se describen los microorganismos y los plásmidos utilizados en este trabajo. Asimismo, en la Figura 3 se muestran los mapas de los plásmidos usados.

*Escherichia coli* se cultivó en medio rico LB<sup>57</sup> (diluído al medio) a 37°C. Cuando se utilizó caldo LB para el crecimiento, los cultivos se incubaron en un agitador orbital New Brunswick Scientific, modelo Excella E24 (EE.UU.) ajustado a 200 rpm. Para los cultivos en medio sólido se incorporó 16 g/L de agar.

Las cepas salvajes y recombinantes de *S. cerevisiae* se cultivaron a 30°C en los medios MM con xilosa como fuente de carbono, YPD<sup>58</sup>, YP(1/5)X y en YPX. Las composiciones de los medios se describen en el Anexo. Cuando se utilizó medio de cultivo líquido, éstos se incubaron en un agitador orbital New Brunswick Scientific, modelo Innova<sup>®</sup>43 (EE. UU.), ajustado a 190 rpm. Para preparar los cultivos en medio sólido se incorporó 16 g/L de agar.

Todos los medios se prepararon sin la fuente de carbono y esterilizaron por autoclave. La fuente de carbono se preparó como solución *stock* a una concentración de 200 g/L, se autoclavó y se agregó al medio estéril.

Las soluciones *stock* de antibióticos, Ampicilina (Amp), Cloramfenicol (Cm) y Geneticin (G418) se prepararon a una concentración de 50 mg/mL, se esterilizaron por filtración con filtros PES Syringe Filter (0.45µm) de Starlab Scientific (China), se alicuotaron en tubos de microfuga y se almacenaron en freezer a -20°C hasta su utilización. Estas soluciones se adicionaron a los medios de cultivo estériles antes de inocularlos, a una concentración final de 50 µg/mL. El antibiótico empleado se indica en cada caso.

En el caso del Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido), el mismo se disolvió en dimetilformamida (DMF). Se partió de una solución stock de 20 mg/mL y se adicionó a los medios de cultivos estériles a una concentración final de 20 µg/mL.

Todas las cepas obtenidas en este trabajo se almacenaron a -80°C en tubos de 1,5 mL conteniendo 0,6 mL de suspensión celular crecida durante toda la noche en

medio líquido YPD con el antibiótico adecuado (en caso de ser necesario) y 0,4 mL de solución de glicerol estéril (50%), como fuente de respaldo por períodos prolongados.

**Tabla 2: Cepas y plásmidos**

	<b>Características relevantes</b>	<b>Referencia</b>
<b>Cepa bacteriana</b>		
<i>Escherichia coli</i> TOP10	<i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>rpsL</i> (StrR)	Invitrogen, EE.UU
<b>Cepas de <i>S. cerevisiae</i></b>		
CAT -1	Cepa diploide utilizada para la producción industrial de bioetanol	52
CAT -1- XRT	ΔGRE3::XYL1(K270R),XYL2,XK/ΔGRE3::Gal2(N376F),TAL-1.	59
CAT -1-XIT	ΔGRE3::xylA,XK/ΔGRE3::Gal2,TAL-1.	59
<b>Plásmidos</b>		
pAKX002	Contiene el promotor pTPI1, el gen <i>xylA</i> , que codifica para XI de <i>Piromyces</i> sp. y el terminador tCYC1. Es un plásmido <i>shuttle</i> , Amp <sup>R</sup> , URA3, 2μ ori.	60
pRS42K	Vector <i>shuttle</i> de alto número de copias, Amp <sup>R</sup> y G418 <sup>R</sup> . 2μ ori. Posee el gen α- <i>lacZ</i> .	56
pRS42K::XI	Vector pRS42K que contiene el promotor pTPI1, el gen <i>xylA</i> de <i>Piromyces</i> sp. y el terminador tCYC1 insertados en el sitio de restricción <i>EcoRV</i> interrumpiendo el gen α-	Este trabajo



células contenidas en aproximadamente 4,5 mL de cada cultivo en tubos de microfuga de 1,5 mL. Para ello, el cultivo se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto (min) y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se realizó varias veces hasta recuperar las células en un solo tubo de centrifuga. Se descartó el sobrenadante con un *tip* y las células fueron resuspendidas en 300 µL de solución I (ver anexo) con 2 µL de RNAsa A (10 mg/mL) de Thermo Scientific (EE. UU.). Posteriormente se agregaron 300 µL de solución II (ver anexo) y se mezcló invirtiendo el tubo 4 veces. Luego se agregaron 300 µL de cloroformo y 300 µL de solución III (ver anexo). Los tubos fueron mezclados en *vortex* de forma invertida. Posteriormente, para separar eficazmente el ADN plasmídico de los restos celulares, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4°C, y se transfirió la fase acuosa (que contiene el ADN plasmídico) a un tubo nuevo de microfuga de 1,5 mL. A este último tubo se le agregó 660 µL de isopropanol para precipitar el ADN y se mezcló invirtiendo el tubo. Luego, la suspensión se centrifugó durante 30 min a 14000 rpm y 4°C y se descartó el sobrenadante (que contiene las sales, los restos celulares solubles en agua y alcohol). El *pellet* se resuspendió en 500 µL de etanol 70% (v/v) y se centrifugó durante 5 min a 14000 rpm. Se retiró el sobrenadante, el *pellet* se secó por centrifugación al vacío en un rotaevaporador de marca Labconco (E2M8, Inglaterra) y finalmente se resuspendió en 50 µL de agua ultrapura estéril.

### **5.2.2 Amplificación del fragmento pTPI1-piroXylA-tCYC1 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se amplificó mediante PCR el fragmento que contiene el promotor pTPI1, el ORF *xylA* que codifica para la enzima XI de *Piromyces* sp. (denominado Piro XylA en la Figura 1) y el terminador tCYC1, clonados en el plásmido pAKX002<sup>60</sup>. Para esto, se usaron los cebadores PrXiF1 y PrXiR1 previamente diseñados usando el software Primer-Blast del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Estos cebadores, sintetizados en Macrogen (República de Corea), amplifican un fragmento de 2756 pb a partir del plásmido pAKX002. Las secuencias de los cebadores utilizados son: PrXiF1 5'GAAGTGTAGGGGTCACGCTG 3' (desde la posición 4938pb a la 4957pb del plásmido pAKX002), y PrXiR1 5'CAATACGCAAACCGCCTCTC 3'(desde la posición 57 a la 76 del plásmido pAKX002).

Para optimizar las condiciones de la reacción de PCR se ensayaron diferentes temperaturas de hibridación: 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C y 60 °C. Las reacciones se realizaron en un volumen final 50 µl, conteniendo 25 µL de MangoMix (BIOLINE, UK), 2,5 µL de cada cebador (10 µM), y 1 µL de ADN plasmídico pAKX002, previamente purificado por lisis alcalina. Se usó un termociclador BIOER, modelo TC-E-48D (China). Los programas empleados consistieron en una etapa inicial de 2 min a 95° C; seguida por 35 ciclos de: 95° C durante 30 segundos (seg), (temperatura de hibridación ensayada) durante 30 seg, 70° C durante 1,30 min. La reacción culminó con una etapa final a 70° C durante 5 min.

Una vez definida la temperatura óptima, se realizó la reacción de PCR necesaria para la elaboración del plásmido pRS42K::XI. Dicha reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo 10 µL de *buffer* de PCR (5 X), 1,25 µL del mix de deoxinucleótidos trifosfato (4you4, Reino Unido) (10 µM de cada uno), 0,5 µL de Taq ADN polimerasa *proofreading* (Bioline, EE. UU.). (2,5 U/µL), 2,5 µL de cada cebador (10 µM), 1,5 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, 39%) y 1 µL de ADN plasmídico pAKX002, previamente purificado por lisis alcalina. Se usó un termociclador BIOER, modelo TC-E-48D (China). El programa empleado consistió en una etapa inicial de 2 min a 95° C; seguida por 35 ciclos de: 95° C durante 30 seg, 60° C durante 30 seg, 70° C durante 1,30 min. La reacción culminó con una etapa final a 70° C durante 5 min.

### **5.2.3 Purificación del fragmento amplificado por PCR**

Para purificar el producto amplificado se utilizó el kit “Agarose gel DNA extraction kit”(Roche, EE.UU.). Para esto, el producto de la reacción de PCR se sometió a una corrida electroforética en gel de agarosa 1% (p/v), preparada en *buffer* TAE 1X (ver Anexo).

Una vez visualizada la banda en el gel, se cortó con bisturí el trozo de gel de agarosa que contenía el fragmento de ADN de interés. El fragmento se transfirió a un tubo de microfuga de 1,5 mL. Se adicionó 700 µL de *buffer* de solubilización de agarosa (vial 2). Se dejó reposar el tubo durante 10 min a 65°C en un *termoblock* Thermolyne modelo 17600 (EE.UU.) o hasta que la agarosa se solubilizó totalmente. El tubo se agitó para promover la solubilización de la agarosa. Una vez obtenida una solución homogénea, se colocó el tubo en baño de hielo y se agregó

10  $\mu\text{L}$  de la suspensión de sílica (vial 1). Luego de 10 min de reposo en frío, se centrifugó el tubo por 30 seg a máxima velocidad (13300 rpm) a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió con 500  $\mu\text{L}$  de *Binding buffer* (vial 3) en *vortex*. Se realizó otra centrifugación en las mismas condiciones que la anterior, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces el *pellet* con 500  $\mu\text{L}$  de *Washing buffer* (vial 4) en las mismas condiciones de centrifugación. Luego, se removió todo el líquido posible con un *tip* y se invirtió el tubo en un papel absorbente para dejarlo secar a temperatura ambiente (T.A.) durante 15 min o hasta que el *pellet* estuviera visiblemente seco. Se resuspendió el *pellet* en 25  $\mu\text{L}$  de agua miliQ. Se agitó el tubo en *vortex* y se incubó por 10 min a 56 – 60 °C. Se agitó nuevamente en *vortex* durante 3 min y se centrifugó a máxima velocidad por 30 seg. Se transfirió el sobrenadante conteniendo el ADN disuelto a un tubo nuevo de microfuga. Se repitió este paso una vez más. Se guardaron ambos sobrenadantes rotulados en freezer a -20°C hasta su utilización. . Se chequeó la pureza y concentración del ADN obtenido en gel de agarosa 1% (p/v), preparada en *buffer* TAE 1X (como se detalla en Anexo).

#### **5.2.4 Construcción del plásmido pRS42K::XI: digestión del vector pRS42K y ligación con el fragmento amplificado.**

El vector pRS42K se digirió con la enzima de restricción *EcoRV*. Para ello, se mezcló en un volumen final de 30  $\mu\text{L}$  (siguiendo las instrucciones del fabricante), 1 $\mu\text{L}$  de la enzima *EcoRV* (Thermo New England BioLabs, EE. UU.), 3 $\mu\text{L}$  de *buffer* 3 (10X) (New England BioLabs, EE. UU.), 11  $\mu\text{L}$  de agua miliQ estéril y 15  $\mu\text{L}$  del vector. La mezcla de digestión se incubó por 24 horas a 37°C. Se verificó que la reacción de digestión hubiese sido exitosa mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en *buffer* TAE 1X. Luego se procedió a la ligación del plásmido digerido con el fragmento de interés (producto de purificación). Dicha ligación se realizó en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción contenía 6  $\mu\text{L}$  del producto de PCR purificado, 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla de digestión que contiene pRS42K digerido, 1  $\mu\text{L}$  de *buffer* 10X de ligación y 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligasa (360 U/ $\mu\text{L}$ ) de TaKaRa (Japón). La mezcla de ligación se incubó durante 30 min a 16°C en un *termoblock* Thermolyne modelo 17600 (EE.UU.). En teoría, el número de moléculas de fragmento a insertar en relación a las del vector debería ser 1:1. En general se usa una relación mayor, esto aumenta la probabilidad de que el fragmento se una al

vector en vez de la recircularización del mismo. El volumen de ligación pequeño también favorece las reacciones de ligación intermoleculares.

### **5.2.5 Preparación de células competentes de *E. coli* TOP10<sup>62</sup>**

A partir de un cultivo fresco de *E. coli* TOP10 en medio LB agar, se inoculó un tubo conteniendo 5 mL de caldo LB y se incubó con agitación durante toda la noche. Se usaron 3 mL de este cultivo para inocular 300 mL de caldo LB. Este último se incubó con agitación hasta alcanzar una densidad óptica ( $DO_{600nm}$ ) de 0,2-0,3, medida en un espectrofotómetro visible-UV Shimadzu, modelo UV-1800 (Japón) (se utilizó como blanco de absorbancia medio LB). Se colectaron las células en tubos Falcon® de 50mL por centrifugación a 5000 rpm por 10 min a 4 °C y se lavó el *pellet* de células con una solución estéril fría de  $CaCl_2$  0,1 M, manteniendo las mismas condiciones de centrifugación. Luego se resuspendió el *pellet* en 5 mL de  $CaCl_2$  0,1 M frío y se incubó la suspensión durante 30 min en baño de hielo. Por último, se centrifugó nuevamente la suspensión en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 2 mL de  $CaCl_2$  0,1 M, glicerol 20% (v/v). Se transfirieron volúmenes de 100  $\mu$ L de esta suspensión celular a tubos de microfuga estériles de 1,5 mL y se guardaron a -80°C hasta su utilización (durante un período máximo de 4 meses).

### **5.2.6 Transformación de células de *E. coli* TOP10 (químicamente competentes) con la mezcla de ligación<sup>62</sup>.**

A un tubo de microfuga conteniendo 100  $\mu$ L de células competentes de *E. coli* TOP10 preparadas previamente, se le agregó 10  $\mu$ L de la mezcla de ligación en condiciones asépticas. Se incubó la mezcla en baño de hielo durante 30 min, luego se incubó 2 min a 42°C y 2 min más en hielo. Inmediatamente se le agregó 1 mL de caldo LB al tubo de reacción y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación. En paralelo, en otro tubo de reacción, se realizó el mismo proceso pero sin el agregado del producto de ligación, siendo éste el control negativo. Alícuotas de la mezcla de transformación y del control negativo se sembraron en placas de LB agar con Amp y Xgal. La presencia de antibiótico selecciona las células que hayan incorporado el plásmido, y el Xgal permite identificar las colonias que hayan incorporado el vector con inserto (colonias blancas). Se repicaron las colonias blancas a placas nuevas con LB agar con Amp. Se realizó la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina

(protocolo en punto 4.2.1) de estas colonias para verificar la presencia de la construcción deseada.

### **5.2.7 Selección del plásmido pRS42K::XI**

Una vez efectuada la purificación plasmídica a partir de cada clon, se evaluó si los mismos contenían el inserto de interés. Para esto, se digirió con *EcoRI* (10 U/ $\mu$ L)(Thermo Scientific, EE. UU.), utilizando las mismas condiciones de la digestión realizada anteriormente con *EcoRV*. Las mezclas de digestión se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa 1% TAE 1X para verificar si los tamaños de los fragmentos digeridos coincidían con lo esperado. Los plásmidos purificados que exhibieron el perfil esperado fueron enviados a MACROGEN (República de Corea) para secuenciar el inserto, empleando el cebador PrXiR1 reverso. La secuencia obtenida se analizó usando el programa BLASTn del NCBI y se alineó contra la base de datos de nucleótidos del mismo ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)). Además, se alineó la secuencia nucleotídica obtenida por secuenciación con la secuencia del plásmido pAXK002, empleando el programa MEGA versión 7<sup>63</sup>.

### **5.2.8 Transformación de levaduras (protocolo modificado de Gietz, D. y col, 1992<sup>64</sup>)**

Se inocularon tubos conteniendo 5 mL de caldo YPD con células frescas de CAT-1, CAT-1-XRT y CAT-1-XIT crecidas en placas de YPD agar y se incubaron durante 24 horas aproximadamente. Se utilizó 0,5 mL de cada cultivo para inocular frascos conteniendo 50 mL de caldo YPD. Estos frascos fueron incubados a 30°C con agitación orbital (aproximadamente por 4 horas) hasta alcanzar a una  $DO_{600nm}$  de 1 aproximadamente (espectrofotómetro visible-UV Shimadzu modelo UV-1800). Luego se colectaron las células por centrifugación durante 3 min a 3000 rpm en tubos Falcon® estériles de 50 mL. En cada caso se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 1 mL de 1 X LITE (ver Anexo). Cada una de estas suspensiones celulares se transfirieron a tubos de microfuga de 1,5 mL estériles y se centrifugaron durante 2 min a 3000 rpm. El sobrenadante se descartó y los *pellets* de cada cepa se resuspendieron en 300  $\mu$ L de 1 X LITE. Para cada cepa, se transfirieron 100  $\mu$ L de la suspensión celular a dos tubos nuevos de microfuga

estériles. Seguidamente, a cada tubo se le añadió 10 µL de ADN de esperma de salmón (10 mg/mL) (Invitrogen, EE.UU.) previamente desnaturalizado a 100°C durante 10 min en *thermoblock* (Thermolyne modelo 17600) seguido de incubación en hielo hasta su utilización. A un tubo de cada cepa se le adicionó, además, 10 µL del ADN plasmídico purificado previamente (entre 5-10 µg de ADN). Luego, a todos los tubos se les adicionó 750 µL de PEG LITE (ver Anexo) y se incubaron a 30°C durante 30 min en *thermoblock*, agitando las suspensiones de forma manual cada 10 min. Posteriormente, se adicionó 100 µL de DMSO a cada tubo de transformación, se incubó a 42°C durante 10 min y se centrifugó durante 2 min a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante de cada tubo, los *pellets* celulares se resuspendieron en 300 µL de caldo YPD y los tubos se incubaron en estufa durante 1 hora a 30°C grados para recuperar las células.

Finalmente, se sembró por rastrillado en superficie, 150 µL de cada suspensión celular en placas con YPD agar con G418 y las mismas se incubaron por 72 hs a 30°C.

En todos los casos se realizó un control negativo siguiendo el mismo protocolo pero sin el agregado de ADN plasmídico. Este control se plaqueó en YPD sin antibiótico para comprobar la viabilidad de las células y en YPD con G418 para comprobar que la resistencia al antibiótico se debe a la presencia del plásmido únicamente.

### **5.2.9 Ensayos de evoluciones**

Luego de obtenidas las cepas resistentes a G418: CAT-1 (pRS42K::XI), CAT-1-XRT (pRS42K::XI) y CAT-1-XIT (pRS42K::XI) se aplicó un protocolo de evolución. El mismo, tiene como objetivo seleccionar aquellas células que por algún tipo de modificación puedan crecer en un medio que tiene xilosa como principal fuente de carbono. En estas condiciones, van a surgir mutaciones espontáneas que pueden ser o no favorables para que las cepas crezcan utilizando la fuente de carbono. Probablemente, las cepas seleccionadas al final del proceso serán aquellas que presenten una mutación favorable. Para que esto suceda, se realizan pasajes sucesivos de las cepas a evolucionar en un medio selectivo cada 48 hs.

En este caso se partió de un cultivo primario por cada cepa. Los ensayos de crecimiento fueron realizados en tubos con tapa rosca con septo conteniendo 30 mL de YPD y G418 y se incubaron durante 24 horas. Se colectaron las células por centrifugación en tubos Falcon® a 5000 rpm durante 6 min. El *pellet* de células se lavó dos veces con 1 mL de agua destilada estéril, usando las mismas condiciones de centrifugación. La suspensión de células se usó para inocular un nuevo frasco tapa rosca con septo con 30 mL de medio MM xilosa con G418.

Estos cultivos se incubaron a 30°C con agitación orbital. Luego de 48 horas, las células se colectaron por centrifugación y se transfirieron en su totalidad a otro frasco de tapa rosca con septo conteniendo 30 mL de medio MM xilosa y G418. Nuevamente se incubó a 30°C con agitación orbital por 48 horas. Este proceso se repitió 10 veces.

En cada paso de la evolución se realizó un control de contaminación estriando una alícuota del cultivo en placas de petri conteniendo medio YPD sin antibiótico, las mismas se incubaron a 30°C por 24-48 horas.

Se guardó en glicerol un *pool* celular de cada etapa a partir de un cultivo primario en YPD sembrado de las placas control. Los siguientes ensayos se realizaron a partir de las cepas presentes en la placa control.

### **5.3 Ensayos de producción de etanol**

Para los ensayos de consumo de xilosa y producción de etanol se partió de un cultivo primario en YPD (y antibiótico, en caso de ser necesario) de la cepa o el *pool* de cepas implicadas en cada ensayo. Estos cultivos se incubaron a 30°C con agitación orbital durante 24 horas. Se colectaron las células por centrifugación a 5000 rpm durante 6 min. Se lavó el *pellet* dos veces con 1,5 mL de agua destilada estéril, manteniendo las condiciones de centrifugación. Las células suspendidas en agua ultrapura se usaron para inocular los frascos con tapa de rosca con septo con medio YP(1/5)X o MM (en cada caso se detalla la concentración de xilosa utilizada) de modo que la  $DO_{600nm}$  inicial fuese aproximadamente 0,5. Por último, los cultivos se incubaron a 30°C con agitación orbital y se tomaron muestras de forma aséptica a diferentes tiempos para realizar determinaciones de biomasa, así como de las concentraciones de xilosa y etanol presentes en el sobrenadante.

### 5.3.1 Evaluación del consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento.

Este ensayo se realizó en frascos con tapa rosca con septo (capacidad total 40 mL aproximadamente) conteniendo 20 mL de medio de cultivo MM o YP(1/5)X<sub>20g/l</sub> y G418 en el caso de que corresponda. Los cultivos primarios se realizaron en tubos Falcon® de 50 mL conteniendo 30 mL de caldo YPD con G418 en caso de corresponder, crecidos por 24 horas. Los ensayos se efectuaron por triplicado para cada una de las cepas que se muestran en la Tabla 3. Se colectaron muestras a las 0 y 72 horas para determinar biomasa y concentración de xilosa y etanol en el medio de cultivo.

**Tabla 3 Cepas utilizadas en el ensayo de evaluación del consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento.**

Cepas sin plásmido	Cepas con plásmido	<i>Pool</i> de cepas con plásmido evolucionadas (parte de la suspensión resultante)
CAT-1	CAT-1(pRS42K::XI)	CAT-1(pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evolución
CAT-1-XRT	CAT-1-XRT (pRS42K::XI)	CAT-1-XRT(pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evolución
CAT-1- XIT	CAT-1-XIT (pRS42K::XI)	CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evolución

### 5.3.2 Evaluación del crecimiento y consumo de xilosa a las 72 horas de incubación de CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10<sup>ma</sup> evolución en presencia de diferentes concentraciones de xilosa.

El cultivo primario se realizó en un frasco Wheaton® de 250 mL conteniendo 50 mL de medio YPD y G418 inoculado con células de la cepa CAT-1-XIT(pRS42K::XI) obtenidas a partir de la 10<sup>ma</sup> evolución, provenientes de una placa fresca con YPD agar con G418. El ensayo se realizó, por triplicado en frascos Wheaton de 250 mL conteniendo 65mL de YP(1/5)X con diferentes concentraciones iniciales de xilosa: 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, 60g/L y 80 g/L. Se colectaron muestras (tres por

condición) a las 0 y 72 horas para medir peso seco de biomasa, concentración de xilosa y etanol en el sobrenadante.

### **5.3.3 Perfil de crecimiento, consumo de xilosa y producción de etanol de la cepa CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10<sup>ma</sup> evolución.**

Se partió de un cultivo primario de la cepa CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10<sup>ma</sup> evolución realizado en frascos Wheaton® de 250 mL conteniendo 100 mL de medio YPD, G418 y Cm (para inhibir el crecimiento bacteriano). Se inocularon 3 frascos Wheaton® de 250 mL con 100 mL de YP(1/5)X<sub>47g/L</sub>. Además se realizó un control negativo con 100 mL de YP(1/5). Se colectaron muestras de forma aséptica cada 12 horas (aproximadamente) por 132 horas para la determinación de biomasa y concentración de xilosa y etanol en el medio de cultivo.

### **5.3.4 Determinaciones analíticas**

#### **5.3.4.1 Biomasa**

Se tomó una muestra de 1,5 mL de cada cultivo en los tiempos determinados para cada ensayo. La suspensión de células se transfirió a tubos de 1,5 mL previamente secados a 60°C por 48 horas y pesados en balanza analítica. Las muestras se centrifugaron por 6 min a 5000 rpm y se guardó el sobrenadante a -20°C para la posterior determinación de concentración de xilosa y etanol. El *pellet* celular se lavó dos veces con agua destilada (centrifugando en las mismas condiciones) y se secó en estufa a 60°C por 48 horas o hasta peso constante. Luego se pesaron los tubos con biomasa en balanza analítica. La biomasa (g/L) se determinó como la diferencia de peso entre el tubo con biomasa y el tubo vacío multiplicado por 1000 mL y dividido por 1,5 mL (ya que el peso que medimos es de 1,5 mL de medio).

#### **5.3.4.2 Concentración de xilosa y etanol**

Las determinaciones de xilosa y etanol se realizaron en el Departamento de Bioingeniería (Facultad de Ingeniería, UdelaR), mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de índice de refracción (HPLC-IR, marca Shimadzu, Japón), equipado con una columna de intercambio iónico Aminex 87H (BIORAD) y empleando ácido sulfúrico 0,05 N como fase móvil. El flujo de corrida fue de 0,6 mL por min a 35°C. Se realizaron dos curvas estándar, una para xilosa (concentraciones entre 0,1 g/L y 0,4 g/L) y otra para etanol (concentraciones

entre 0,05 g/L y 0,4 g/L). ). Además se analizaron estándares de xilitol, glicerol y ácido láctico, lo que permitió determinar la presunta presencia o ausencia de estos compuestos en los sobrenadantes estudiados. Las muestras (sobrenadantes obtenidos en el punto 4.3.1.1) se diluyeron de acuerdo a las curvas de calibración empleadas y se filtraron con filtros descartables con tamaño de poro 0,2 $\mu$ m. Se calculó la concentración de xilosa consumida ( $Xil_C$ ) para cada caso ( $Xil_{final} - Xil_{inicial}$ ), el rendimiento de transformación de xilosa consumida en biomasa ( $Y_{biomasa/Xil_C}$ ), el rendimiento de transformación de xilosa consumida en etanol ( $[EtOH]/Xil_C$ ) y la productividad de etanol (g EtOH/L\* horas).

#### **5.3.4.3 Ensayos estadísticos**

Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico Infostat<sup>65</sup> usando ANOVA. Los datos que cumplían con los supuestos para el modelo ANOVA, fueron comparados usando el test de Tukey. En caso de no cumplir con los supuestos del ANOVA, se realizó el test no paramétrico Kruskal Wallis. En todos los casos se usó un p-valor < 0.05

## 6 RESULTADOS

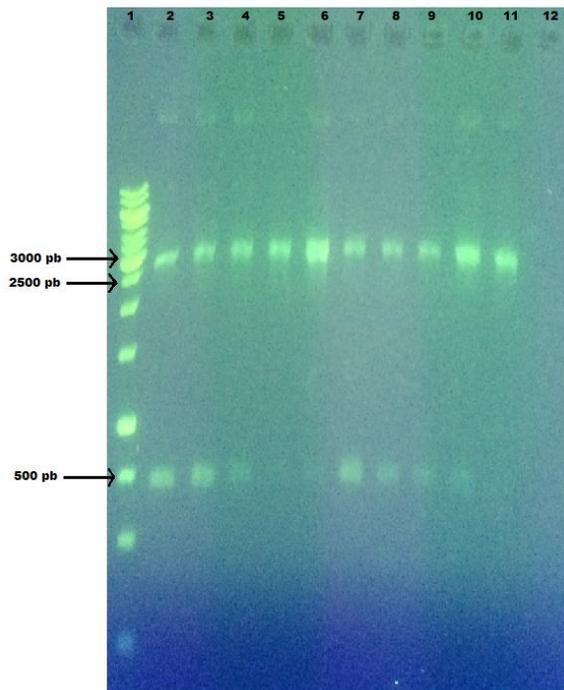
---

### 6.1 Construcción del plásmido pRS42K:XI

Se construyó un plásmido derivado de pRS42K (círculo 2 $\mu$ , G418<sup>R</sup>) conteniendo el gen *xylA* de *Piromyces* sp. bajo el control del promotor pTPI1 y precediendo al terminador tCYC1 (pRS42K::XI).

#### 6.1.1 Amplificación del fragmento pTPI1-XI-tCYC1 mediante PCR

Para la construcción del plásmido se amplificó por PCR un fragmento de ADN que incluye el promotor pTPI1, seguido por la región codificante del gen que codifica para la enzima XI de *Piromyces* sp. (Piro XylA) y el terminador tCYC1, presente en el plásmido pAKX002, tal como se detalla en Materiales y Métodos. Se optimizaron las condiciones de PCR ensayando diferentes temperaturas de hibridación: 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C y 60 °C y diferentes concentraciones de ADN molde: con el vector diluido al medio y al quinto. Para visualizar el resultado, las reacciones de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa (Figura 4).

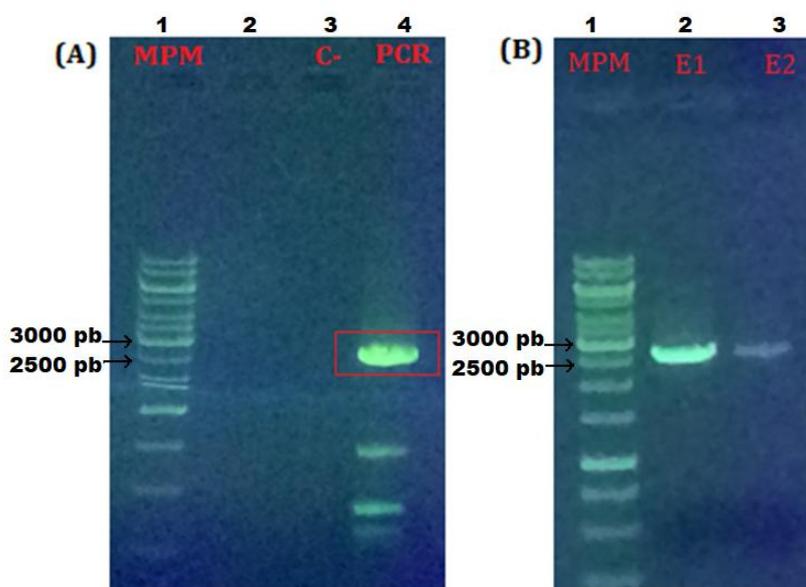


**Figura 4 Electroforesis en gel de agarosa en donde se visualiza el fragmento de ADN amplificado por PCR.** Este ensayo se hizo para optimizar las condiciones de PCR (temperatura de hibridación y concentración de ADN molde) con el objetivo de obtener un fragmento único de amplificación. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: 56 °C, Carril 3: 57 °C, Carril 4: 58 °C, Carril 5: 59 °C, Carril 6: 60 °C. Hasta el carril 6 se utilizó el plásmido pRS42K::XI diluido al quinto. Carril 7: 56 °C, Carril 8: 57 °C, Carril 9: 58 °C, Carril 10: 59 °C, Carril 11: 60 °C Entre el carril 7 y el 11 se utilizó el plásmido pRS42K::XI diluido al medio. Carril 12: control negativo a 56 °C.

Se observó que la concentración de ADN molde utilizada (plásmido pAKX0002) no afectó al producto de PCR, ya que la intensidad del fragmento esperado (indicativa de la cantidad de ADN) es prácticamente la misma para todos los casos (Figura 4). Sin embargo, se observó una diferencia en la presencia de fragmentos más pequeños (producto del pegado inespecífico de los cebadores en el ADN) dependiendo de las temperaturas utilizadas. Los pocillos 6 y 11, los cuales se corresponden con las reacciones hechas a 60 °C, fueron los que presentaron menor cantidad de amplificación inespecífica.

De acuerdo a estos resultados, se realizó la reacción de PCR utilizando una Taq ADN polimerasa *proofreading* empleando 60 °C como temperatura de hibridación. En la figura 5A se muestra el resultado obtenido en la reacción de amplificación, la

cual no fue específica ya que se visualizan varios amplicones de diferentes tamaños.

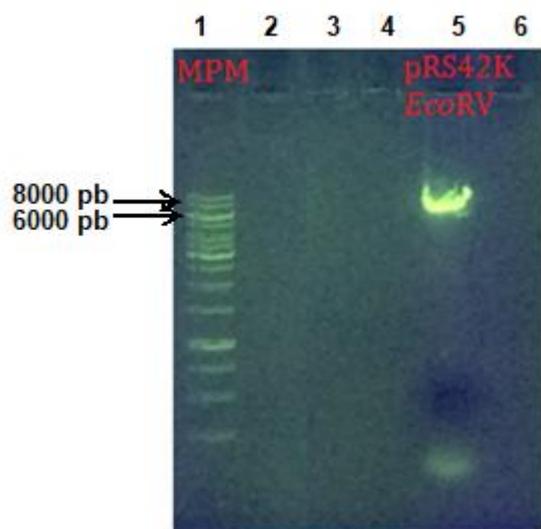


**Figura 5 Perfil electroforético en gel de agarosa en donde se visualizan los fragmentos de ADN amplificados por PCR para construir el plásmido pRS42K::XI.** (A) Resultado de las reacciones de PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM) 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Anexo); Carril 2: sin sembrar; Carril3: control negativo sin molde (C-); Carril 4: reacción de PCR de interés. Con el rectángulo rojo se marca el fragmento de ADN de interés. (B) Resultado de la purificación del fragmento amplificado. En el pocillo 1 se sembró el MPM, en el pocillo 2 la primer elución (E1) de la purificación y en el 3 la segunda elución (E2).

En la figura 5A se puede observar una banda de amplificación entre 2500 y 3000 pb, que probablemente corresponde al fragmento de interés (enmarcada en un recuadro rojo) y tres bandas de tamaños menores, producto del pegado inespecífico de los cebadores a regiones plasmídicas no deseadas. El control negativo (Carril 3) no presenta amplificación. Por otro lado, en la figura 5B podemos observar el resultado de la purificación del fragmento de interés empleando un kit de extracción de ADN a partir de geles de agarosa. Se puede estimar que el fragmento de interés se logró purificar correctamente, ya que se visualiza una sola banda del tamaño deseado (3000-2500 pb) tanto en la primera elución (carril 2) como en la segunda elución (carril 3).

### 6.1.2 Digestión del vector pRS42K y ligación con el amplicón purificado

Se digirió el plásmido pRS42K con la enzima de restricción *EcoRV*. En la Figura 6 se muestra el resultado de la reacción de digestión, en la cual se esperaba obtener un fragmento de 6006 pb.



**Figura 6: Perfil electroforético de la reacción de digestión del plásmido pRS42K con *EcoRV*.** Carril 1: MPM; Carril 2, 3 y 4: sin sembrar; Carril 5: 5  $\mu$ l de reacción de digestión.

La reacción de digestión generó una única banda que se encuentra entre las bandas de 6000 pb y 8000 pb del marcador de peso molecular. Estimamos que el vector se digirió correctamente, dado que se visualiza una única banda del tamaño esperado para el plásmido en una forma lineal. Esta digestión se ligó con el fragmento de PCR purificado (en el punto 5.1.1) como se describe en Materiales y Métodos.

### 6.1.3 Transformación química de células de *E. coli* TOP10 con la mezcla de ligación.

Esta mezcla de ligación se usó para transformar células químicamente competentes de *E. coli* TOP10, como se describe en Materiales y Métodos. La mezcla de transformación se sembró por rastrillado en placas conteniendo LB agar Amp Xgal. Luego de incubarlas durante 24 horas a 37°C, se seleccionaron 2 colonias blancas. Las mismas se re-estriaron en placas con el mismo medio y a partir de dicho cultivo se sembraron en caldo LB Amp. Se purificó el ADN plasmídico de ambos clones como se describe en Materiales y Métodos.

### 6.1.4 Verificación de la construcción deseada en los plásmidos purificados

Para verificar la correcta inserción del gen *xylA* en el vector pRS42K, ambas preparaciones plasmídicas fueron digeridas con la enzima de restricción *EcoRI*. De acuerdo al mapa de restricción deducido y dependiendo de la orientación en la que se insertó el amplicón, se espera obtener dos fragmentos de restricción de 1031 pb y 7633 pb (orientación 1) o de 1640 pb y 7024 pb (orientación 2) (Figura 7).

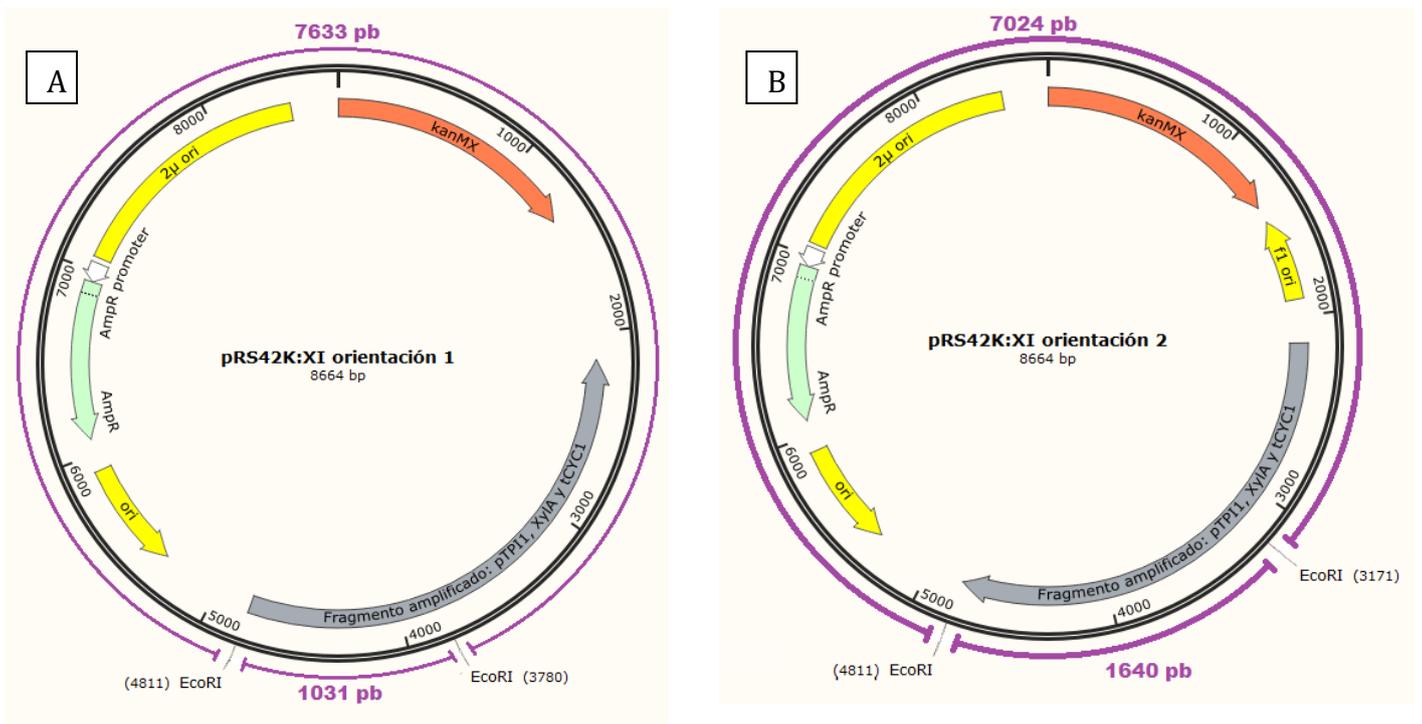
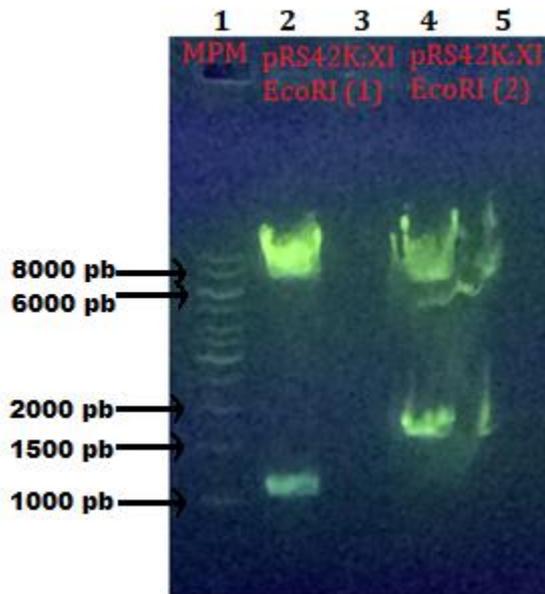


Figura 7: Diagrama de corte y fragmentos esperados para el clonado del amplicón. (A) en la orientación 1. (B) en la orientación 2.



**Figura 8 Perfil electroforético en gel de agarosa de los plásmidos purificados a partir de ambos clones, digeridos con *EcoRI*.** Carril 1: MPM, Carril 2: Digestión plasmídica clon 1, Carril 3: Vacío, Carril 4: Digestión plasmídica clon 2, Carril 5: Vacío.

Los ADN plasmídicos digeridos con *EcoRI* provenientes de las 2 colonias seleccionadas, presentaron perfiles de restricción que coinciden con lo esperado (Figura 8). En base a lo observado en la figura 8, el plásmido pRS42K::XI (1) (cargado en el carril 2) parecería presentar la orientación 1 (Figura 7A) y pRS42K::XI (2) (cargado en el carril 4) probablemente presente la orientación 2 (Figura 7B). Ambas preparaciones de ADN plasmídico se enviaron a secuenciar a MACROGEN. Se realizó el análisis por BLASTn, usando las secuencias nr (*non-redundant nucleotidic sequences*) como banco de datos del Genbank. Se analizó una de las preparaciones plasmídicas (la 1), ya que la otra construcción no pudo ser secuenciada debido a inconvenientes en el proceso de transporte. Los resultados del análisis permitieron confirmar la identidad del fragmento clonado. La secuencia obtenida a partir del cebador reverso (PrXiR1) exhibió una alta similitud con parte del gen *xylA* de *Piromyces* sp. (amplicón de 500 pb) (Número de acceso: AJ249909.1). La secuencia presentó una identidad del 98% comparada con la secuencia de *xylA* (e-value 0.0 y una cobertura del 70%). Por otro lado, al alinear mediante el programa MEGA 7 las secuencias nucleotídicas del vector parental pAKX002 y del plásmido obtenido en nuestro estudio, el apareamiento fue perfecto (sin *mismatches* y con un 100% de identidad). Sin embargo, la secuencia del

amplicón obtenida a partir del cebador *forward* (PrXiF1) tenía una muy mala calidad de secuenciación, lo que no permitió realizar ningún análisis de similitud.

### **6.1.5 Transformación de levaduras**

Se transformaron las levaduras con el plásmido construido y verificado previamente. Se lograron construir las cepas CAT-1(pRS42K::XI), CAT-1-XRT(pRS42K::XI) y CAT-1-XIT(pRS42K::XI), las cuales crecieron en medio YPD con G418. Los controles negativos (CAT-1, CAT-1-XRT y CAT-1-XIT) no crecieron en placas con medio YPD G418 y el control de viabilidad (CAT-1, CAT-1-XRT y CAT-1-XIT en YPD) creció correctamente.

### **6.1.6 Evolución**

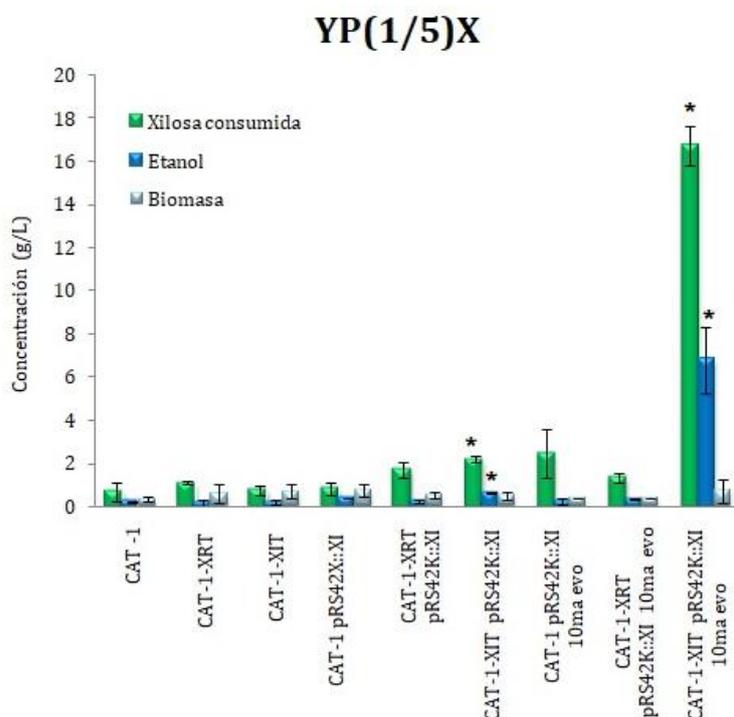
Se realizó un protocolo de evolución de diez rondas sobre las cepas CAT-1(pRS42K::XI), CAT-1-XRT(pRS42K::XI) y CAT-1-XIT(pRS42K::XI) en medio MM con xilosa como única fuente de carbono y G418. A partir del mismo se obtuvieron 3 comunidades celulares diferentes (una por cada cepa) adaptadas en mayor o menor medida al crecimiento en MM xilosa.

## **6.2 Ensayos de producción**

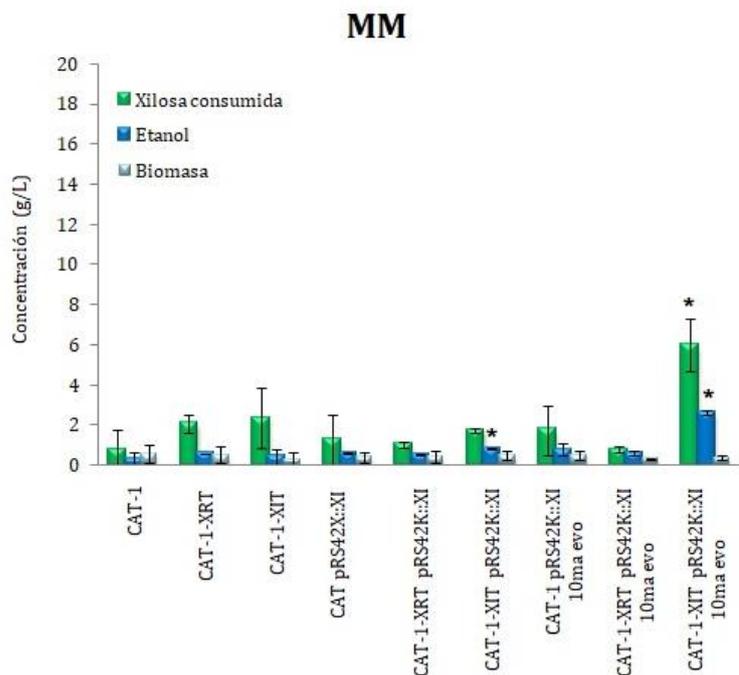
### **6.2.1 Evaluación de consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento.**

Se realizó un ensayo de evaluación de crecimiento (biomasa), consumo de xilosa y producción de etanol en cultivos de las distintas cepas obtenidas, incubados durante 72 horas a 30°C. Se analizaron las cepas: CAT-1-XRT, CAT-1-XIT, CAT-1(pRS42K::XI), CAT-1-XRT(pRS42K::XI), CAT-1-XIT(pRS42K::XI), CAT-1(pRS42K::XI) (alícuota de comunidad de la 10<sup>ma</sup> evolución), CAT-1-XRT(pRS42K::XI) (alícuota de comunidad de la 10<sup>ma</sup> evolución), CAT-1-XIT(pRS42K::XI) (alícuota de comunidad de la 10<sup>ma</sup> evolución) y la cepa control CAT-1. Dicho ensayo se desarrolló en frascos con tapa de rosca con septo, intentando mantener un acceso limitado al O<sub>2</sub>. Los medios de cultivo usados fueron: MM xilosa e YP(1/5)X. En general, el comportamiento relativo de las distintas cepas analizadas fue similar en ambos medios comparándolas con la cepa salvaje CAT-1, aunque el consumo de xilosa y producción de etanol fue notoriamente mayor en algunos clones cultivados en medio YP(1/5) (Figuras 9 y

10). Las cepas que tienen en su genoma el gen *xylA* de *S. coelicolor* y el plásmido multicopia con el gen *xylA* de *Piromyces* sp. presentaron diferencias significativas (marcadas con asterisco en las figuras 9 y 10), tanto en la producción de etanol como en el consumo de xilosa, comparados con la cepa salvaje CAT-1. Además, los clones contenidos en el *pool* celular de la décima evolución (CAT-1-XIT(pRS42K:XI)(10<sup>ma</sup> evolución)) superaron con creces la producción de etanol y el consumo de xilosa respecto al resto. Sin embargo, los valores de producción de etanol y consumo de xilosa fueron más elevados en el medio YP(1/5)X (Figura 9) comparado con el medio MM (Figura 10). La comunidad CAT-1-XIT (pRS42K::XI) contenida en el *pool* de la 10<sup>ma</sup> evolución produjo 6,8 g/L de etanol, consumiendo el 91% de xilosa total que contenía el medio inicialmente (20 g/L). El rendimiento en la producción de etanol (EtOH/Xilc) por parte de esta cepa fue 0,40 g/g. Por otro lado, los mismos clones en medio MM produjeron menor concentración de etanol (2,6 g/L), consumiendo únicamente el 30% de xilosa total, pero alcanzando un rendimiento de etanol mayor (0,45 g/g). La Tabla con los valores de estos resultados se muestra en el Apéndice.



**Figura 9 Consumo de xilosa y producción de etanol y biomasa de las distintas cepas evaluadas.** Las medidas fueron determinadas a las 72 horas de incubación en medio YP(1/5)X. Los asteriscos señalan las diferencias significativas comparadas con la cepa control CAT-1. Las barras de error representan la desviación estándar.



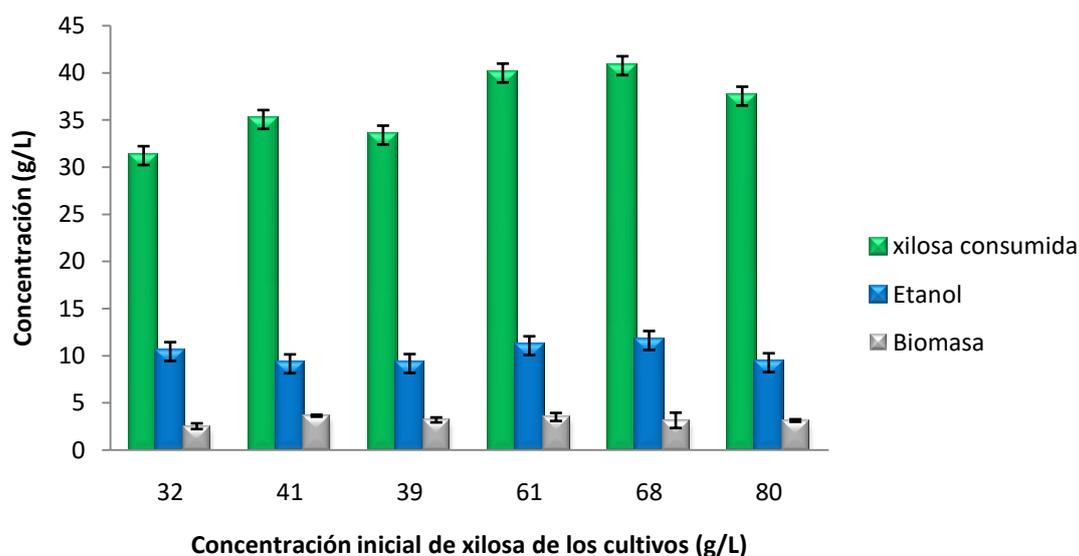
**Figura 10 Consumo de xilosa y producción de biomasa y etanol de las distintas cepas analizadas.** Los cultivos en medio MM con 20 g/L de xilosa inicial fueron analizados a las 72 horas de incubación. Los asteriscos señalan las diferencias significativas al ser comparados con la cepa control CAT-1. Las barras de error representan la desviación estándar.

De todas formas, hay que destacar que tanto el medio MM como YP(1/5) contienen otros componentes que pueden ser utilizados como fuentes de carbono fermentables; por lo que, aunque estos se encuentren en baja cantidad, no se puede asignar dichos rendimientos específicamente a la xilosa. Respecto a la biomasa, en ambos medios, no se encontraron diferencias significativas entre ninguna de las cepas ensayadas.

No se detectó la presencia de xilitol en los sobrenadantes de ninguno de los cultivos analizados. Sin embargo, en el sobrenadante de los cultivos en medio YP(1/5)X se detectaron dos sub-productos, los cuales, según el tiempo de retención de los mismos, podrían ser ácido láctico y glicerol. La presencia del pico correspondiente al presunto ácido láctico se halló en los sobrenadantes de todas las construcciones que contenían el plásmido pRS42K::XI cultivadas en el medio YP(1/5)X. El glicerol se detectó únicamente en el sobrenadante del cultivo CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10<sup>ma</sup> evolución.

### 6.2.2 Evaluación del *pool* CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10<sup>ma</sup> evolución crecido durante 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de xilosa.

En base a los resultados del ensayo anterior, se evaluó el consumo de xilosa, generación de biomasa y producción de etanol del *pool* CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10<sup>ma</sup> evolución crecido en medio YP(1/5) y en presencia de diferentes concentraciones de xilosa inicial (32 g/L, 41 g/L, 38 g/L, 61 g/L, 68 g/L, 80 g/L). Las determinaciones se efectuaron a las 72 horas de incubación. No se detectaron diferencias significativas en el consumo de xilosa, la producción de etanol y la biomasa generada entre los cultivos, abarcando valores desde 31,2 hasta 40,8 g/L de xilosa consumida y entre 9,1 hasta 11,6 g/L de etanol producido, tal como se muestra en la Figura 11. El único cultivo que en las 72 hs consumió casi la totalidad de xilosa (96%) fue el que partió de una concentración inicial de 32 g/L.

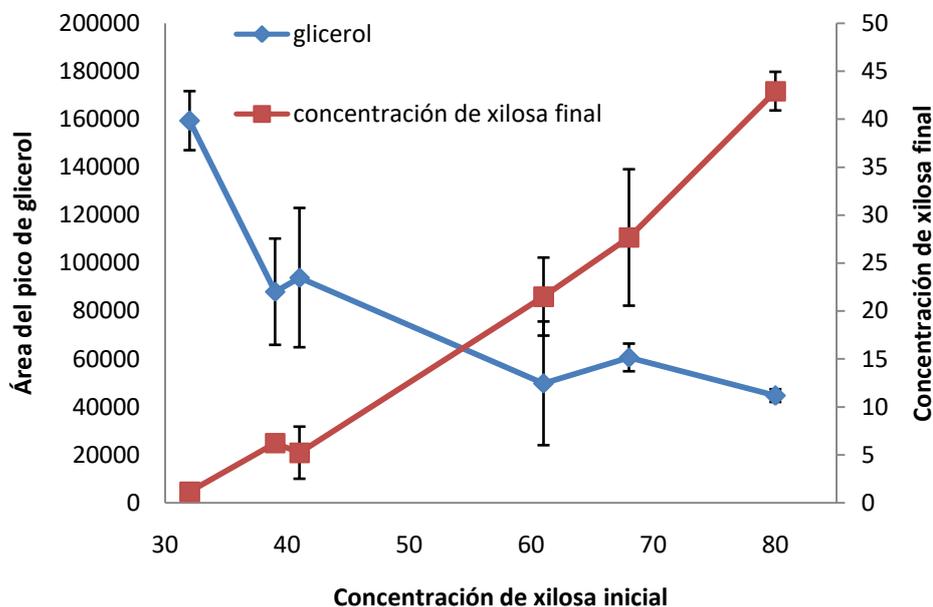


**Figura 11 Consumo de xilosa y producción de etanol y biomasa de CAT-1-XIT(pRS42K::XI)10<sup>ma</sup> evolución crecida en YP(1/5) y diferentes concentraciones de xilosa.** Las determinaciones se efectuaron a las 72 horas de incubación. En el eje X se marcan las diferentes concentraciones iniciales de xilosa en cada cultivo. El eje de las ordenadas representa las concentraciones (g/L) de etanol y biomasa producida y xilosa consumida. Las barras de error representan la desviación estándar.

Por otro lado, el rendimiento de etanol se mantuvo igual para todos los cultivos, presentando valores desde 0,34 g/g para el cultivo con 32 g/L de xilosa hasta 0,25 g/g para el cultivo con 80 g/L de xilosa. La Tabla con todos los resultados se detalla en el Apéndice.

Cabe recordar que el medio YP(1/5) contiene otros componentes (peptona y extracto de levadura) que pueden ser utilizados como fuentes fermentables; por lo cual, en principio, no se puede asignar dichos rendimientos específicamente a la xilosa.

Además del etanol, se observó nuevamente la presencia de glicerol. Si bien no se realizó curva de calibración para el mismo, observando las áreas de los picos del cromatograma (HPLC-IR), se puede estimar que cuanto menor es la concentración final de xilosa mayor es la concentración final de glicerol en el sobrenadante (Figura 12). También se detectó la presencia del pico correspondiente al ácido láctico, con aproximadamente la misma concentración para todos los medios (estimado a partir del promedio de las áreas).



**Figura 12** Gráfico del área del pico de glicerol y concentración final de xilosa en el sobrenadante de CAT-1-XIT(pRS42K::XI) en función de la concentración inicial de xilosa en medio YP(1/5)X. Las barras de error representan la desviación estándar.

### 6.2.1 Perfil de crecimiento, consumo de xilosa y producción de etanol de CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10<sup>ma</sup> evolución.

Se realizó un ensayo de crecimiento en medio YP(1/5) con una concentración inicial de xilosa de 55 g/L. Se determinó la concentración de xilosa y etanol presentes en el sobrenadante del cultivo cada 12 horas, durante 11 días. En la Figura 13 se puede observar que a partir de las 48 horas hasta el final del ensayo, el descenso de la concentración de xilosa (de 39,4 a 14,5 g/L) se corresponde con un aumento en la concentración de etanol (de 0,7 a 12,6 g/L). Esto da como resultado un rendimiento específico (g de etanol producidos desde las 48 hs hasta el final del proceso/ g de xilosa consumida en el mismo periodo) de 0,47 g/g. Sin embargo, el rendimiento de etanol global del proceso fue más bajo (0,31 g/g) que el teórico, al igual que la productividad de etanol a lo largo de todo el proceso (0,09 g/L\*h).

Por otro lado, el aumento de la biomasa fue paulatino a lo largo de todo el cultivo, partiendo de valores de 0,3 g/L y llegando hasta 4,0 g/L. La Tabla con todos los resultados se detalla en el Apéndice.

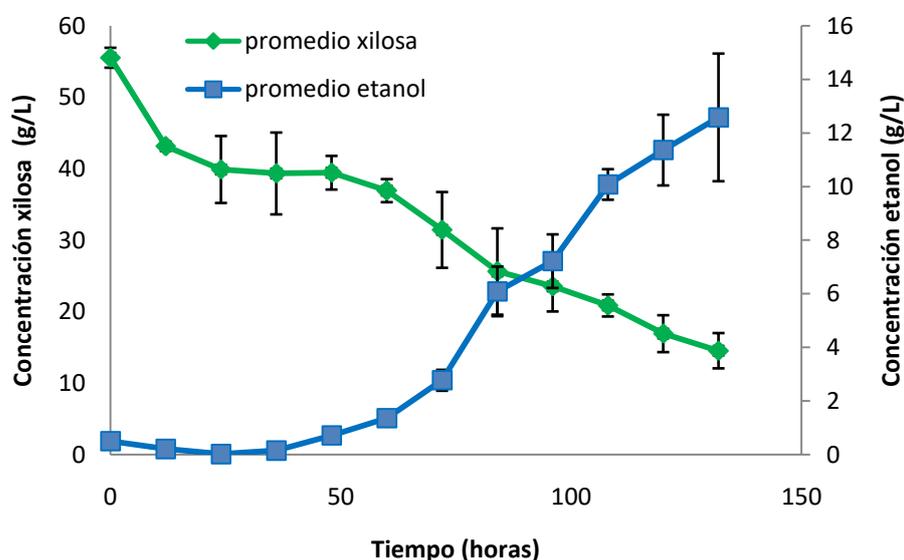


Figura 13 Perfil de las concentraciones de xilosa y etanol producido por CAT-1-XIT(pRS42K::XI)10<sup>ma</sup> evolución a lo largo del tiempo. Las barras de error representan la desviación estándar.

Paralelamente, se realizó un ensayo control de CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10<sup>ma</sup> evolución cultivada en YP(1/5) en ausencia de xilosa para poder evaluar la

producción de etanol por componentes inherentes al medio aparte de la xilosa (peptona y extracto de levadura). Dicho control produjo 0,02 g/L de etanol en los 11 días (132 horas).

Por último, en este ensayo de perfil de crecimiento con xilosa, al igual que en el ensayo anterior, a partir de las 72 horas, se detectó la presencia de glicerol y ácido láctico en el medio y la concentración de ambos fue en aumento a medida que la concentración de xilosa disminuyó en el tiempo (Figura 13).

## 7 DISCUSIÓN

---

En este trabajo se construyó el plásmido pRS42K::XI a partir del vector círculo 2 $\mu$  pRS42K y de un fragmento de ADN que contiene: el promotor pTPI1, el ORF *xylA* que codifica para la enzima XI de *Piromyces* sp. y el terminador tCYC1. Se transformaron las cepas recombinantes CAT-1, CAT-1-XRT y CAT-1-XIT con el plásmido resultante y se aplicó un protocolo de evolución en medio MM que contenía xilosa como única fuente de carbono.

La presencia del plásmido en las levaduras transformadas se evaluó únicamente por adquisición de resistencia antibiótica. De esta forma se verificó que el control negativo fuese sensible al antibiótico G418, mientras que las levaduras que adquirieron el plásmido tuvieron fenotipo de resistencia. Si bien este mecanismo de selección en cierta medida demuestra la correcta adquisición del plásmido y asegura su mantenimiento, sería más preciso confirmarlo mediante una PCR con cebadores que hibriden en el gen *xylA* de *Piromyces* sp., presente en aquellas levaduras resistentes conteniendo el plásmido pRS42K::XI. Esta técnica demostraría no sólo la presencia del plásmido sino que también de dicho gen. También se podría realizar una reacción de RT-qPCR para verificar que dicho gen está siendo transcrito o la determinación de la actividad xilosa isomerasa en extractos libres de células para ver que la enzima se está expresando correctamente.

Por otro lado, para verificar la ausencia de contaminación por bacterias de las muestras evolucionadas, en primera instancia se observó una alícuota del cultivo líquido en microscopio óptico con el lente 100X (datos no mostrados). A primera vista, no se observaron bacterias en dicho preparado. Por otro lado, en el marco de una pasantía efectuada por la estudiante Bach. Florencia Garabato en nuestro laboratorio, se verificó la ausencia de bacterias contaminantes en los cultivos de las distintas evoluciones obtenidas por medio de reacciones de PCR dirigidas a amplificar el gen 16S ARNr (presente únicamente en bacterias).

Aplicar un protocolo de evolución sobre las cepas puede promover a diversos cambios morfológicos, estructurales, transcripcionales, etc. Los protocolos de evolución probablemente resultan en una población heterogénea de levaduras. De

hecho, cuando se verificó la ausencia de contaminación bacteriana por microscopio óptico, también se observó que las levaduras presentaban diferentes tamaños, algunas de ellas de tamaño reducido. Según Morris G. J. y col.<sup>66</sup> la pérdida de viabilidad por parte de la levadura, luego de un choque de estrés hiperosmótico, está directamente relacionada con una disminución en el volumen celular. Los distintos tamaños celulares dentro de la misma población de levaduras evolucionadas, podría ser un indicador de la presencia de diferentes clones con mayor o menor capacidad de resistencia (adquirida por mutaciones aleatorias) frente al estrés hiperosmótico.

Otro cambio que se puede haber dado durante la evolución son modificaciones genéticas que no necesariamente involucren ambos alelos, aumentando así la heterogeneidad alélica a nivel poblacional (mayor cantidad de alelos para un mismo gen). Para analizar los cambios a nivel genético se podría comparar los genomas de la cepa salvaje y clones seleccionados a partir del cultivo resultante de la evolución. Sin embargo, muchas veces los cambios se dan a nivel transcripcional. Dichos cambios podrían ser analizados a través de RNAseq (en donde veríamos el perfil de expresión del clon) o a través de RT-qPCR si quisiéramos ver las diferencias de expresión de uno o algunos gen/es específico/s, como por ejemplo el gen *xyIA*.

## **7.1 Ensayos de producción de etanol**

Se realizaron estudios de producción de bioetanol de las cepas sin el plásmido, con el plásmido y en alícuotas de los crecimientos resultantes de la última etapa de evolución de las cepas recombinantes conteniendo el plásmido. Se evaluó la producción de etanol a diferentes concentraciones iniciales de xilosa de la cepa con mejor *performance* (*pool* de la décima evolución de CAT-1-XIT (pRS42K::XI)), y por último, se determinó su perfil de crecimiento y producción de etanol.

### **7.1.1 Evaluación del consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento.**

Se evaluó la producción de etanol, consumo de xilosa y producción de biomasa en las distintas cepas obtenidas. Luego de 72 h de cultivo, se analizaron las cepas: CAT-1, CAT-1-XRT Y CAT-1-XIT con y sin el plásmido pRS42K::XI. También se analizaron suspensiones celulares de las cepas CAT-1(pRS42K::XI), CAT-1-

XRT(pRS42K::XI) y CAT-1-XIT(pRS42K::XI) luego de 10 ciclos de evolución en presencia de xilosa.

Como se mencionó en Resultados, las cepas que contienen el gen *xylA* de *S. coelicolor* inserto en el genoma y gen *xylA* de *Piromyces* sp. en el plásmido fueron las únicas que produjeron etanol a partir de xilosa (tanto en medio YPX como en medio MM) en un nivel significativamente mayor que la cepa CAT-1 (cepa salvaje). Este resultado refleja la contribución mutua y necesaria de los genes insertos en el cromosoma y del plásmido, para obtener una cepa capaz de metabolizar xilosa. La importancia del trasfondo genético de la cepa (es decir de los genes *xylA* de *S. coelicolor*, TAL-1, XKS1 y Gal2 mutado) y del plásmido que contiene el gen *xylA* de *Piromyces* sp. se observa debido a la incapacidad de la cepa CAT-XIT (que tienen el trasfondo genético pero no el plásmido) y de la cepa CAT-1(pRS42K::XI) (que tiene el plásmido pero no el trasfondo genético), de producir etanol a partir de xilosa como única fuente de carbono.

A su vez, la cepa CAT-1-XRT con el plásmido, la cual se diferencia con CAT-XIT(pRS42K::XI) en que la última tiene el gen *xylA* de *S. coelicolor* en vez de los genes XR y XDH de *S. stipitis*, tampoco produjo etanol en un nivel apreciable. Esto puede deberse a dos causas: que la presencia del gen *xylA* de *S. coelicolor* (inserto en el genoma) es fundamental para lograr una cepa fermentadora de xilosa o que la presencia de los genes XR y XDH de *S. stipitis* generó algún tipo de impedimento para lograr la fermentación.

#### **7.1.1.1 Posibles efectos de la aplicación del protocolo de evolución**

Se observó que la cepa CAT-1-XIT(pRS42K::XI) luego de la evolución produjo mayor cantidad de etanol que la cepa sin evolucionar. La evolución es un enfoque eficiente para adaptar proteínas que requieren funciones refinadas, como mayor estabilidad, tolerancia, especificidad por el sustrato, o ajustar vías metabólicas que puedan dificultar el crecimiento en xilosa<sup>50</sup>.

Lee y col (2012) aplicaron una estrategia que involucraba tres rondas de mutaciones aleatorias del gen *xylA* de *Piromyces* sp. (incrementadas por una PCR propensa a error) seguida de una selección del clon con mayor crecimiento en xilosa como única fuente de carbono. Como resultado, aislaron una variante del

gen xilosa isomerasa con seis mutaciones (E15D, E114G, E129D, T142S, A177T y V433I), las cuales provocaron un aumento de la estabilidad y de la actividad de la enzima en un 77%<sup>50</sup>. Por otro lado, Vieira y col. (2016)<sup>67</sup> aplicaron protocolos de evolución sobre cepas de *S. cerevisiae* (clones haploides) que contenían en el cromosoma los genes: *xylA* de *Orpinomyces* sp., XKS1 y los de la vía PPP (TAL-1, RKI1, TKL1 y RPE1). Luego, analizaron las diferencias genéticas entre los clones previos y posteriores a la evolución e identificaron aquellas mutaciones que aumentaron la producción de etanol a partir de xilosa. Hallaron que se generaron múltiples copias del gen *xylA*, y mutaciones por polimorfismos de única base que generaron la inactivación de los genes SSK2 (miembro de la vía de señalización por MAP quinasa) e ISU1 (proteína de andamiaje involucrada en el ensamblaje de agrupaciones hierro-azufre)<sup>67</sup>. Estos datos muestran que la ingeniería genética de cepas de *S. cerevisiae* capaces de fermentar xilosa se relaciona con una red metabólica compleja, más allá de las “simples” vías de asimilación de xilosa.

Estos cambios producidos aleatoriamente mediante la aplicación del protocolo evolución son posibles escenarios de lo sucedido en la evolución de la cepa CAT-1-XIT(pRS42K::XI) de nuestro estudio.

Por otro lado, dado que los ensayos de evolución se efectuaron en medio MM xilosa, se esperaba que las cepas evolucionadas alcanzaran mayor o igual producción de etanol en esas condiciones de cultivo, comparadas con el medio YP(1/5)X. Sin embargo, esto no sucedió. Se observó que, comparando las mismas cepas en los dos medios, los niveles de etanol producido y consumo de xilosa fueron mayores en el medio YP(1/5)X. Una de las características más destacadas de la *S. cerevisiae* es su capacidad para convertir rápidamente los azúcares en etanol y dióxido de carbono en condiciones tanto anaeróbicas como aeróbicas. En condiciones aeróbicas, la respiración involucra al oxígeno como aceptor final de electrones pero, de todas formas, *S. cerevisiae* mantiene la fermentación alcohólica hasta consumir casi todo el azúcar del medio<sup>68</sup>. Este fenómeno se llama efecto Crabtree<sup>68</sup>. Dicho efecto, da como resultado una menor producción de biomasa ya que una fracción de azúcar se convierte en etanol (y otros productos de fermentación). Esto significa que, comparado con el metabolismo exclusivamente aeróbico, se debe consumir más xilosa para lograr la misma cantidad de biomasa<sup>68</sup>.

Dado que los valores de biomasa alcanzada en ambos medios es la misma, pero los valores de xilosa consumida son mayores en el medio YP(1/5), es probable que este medio posea alguna característica que promueva la ruta fermentativa, excretando etanol. Es por esto que la diferencia de producción de etanol probablemente se deba a las características del medio que favorecen la fermentación y no a una diferencia en el número de levaduras presentes.

Por otro lado, aunque menos probable, también podría deberse a que en el medio MM hay algún componente que inhibe la vía fermentativa.

En los cromatogramas obtenidos por HPLC a partir de los sobrenadantes de estos cultivos se visualizaron otros dos picos, presentes únicamente en los sobrenadantes de medio MM, con un tiempo de retención de 6,8 y 8,5 minutos, los cuales no pudimos identificar. Dichos picos aparecen en las muestras de tiempo inicial (medio sin inocular), por lo que se tratan de componentes del medio y no de metabolitos producidos por la levadura durante el cultivo.

De todas formas, hay que destacar que los productos de fermentación se determinaron a las 72 hs de incubación. El perfil de crecimiento de las levaduras en los dos medios es probablemente diferente. Quizás, a las 72 horas, el cultivo en medio MM se encontraba en la primera etapa de crecimiento celular y no en la etapa exponencial o final. Para hacer ensayos comparativos más precisos sería conveniente analizar el perfil de crecimiento de las levaduras en ambos medios. De ese modo se podrían comparar las mismas etapas de crecimiento en vez de analizar los parámetros en un tiempo determinado.

#### **7.1.1.2 Productos secundarios de fermentación**

En el sobrenadante del medio YP(1/5)X se detectó la presencia de dos productos “secundarios” de fermentación. De acuerdo al tiempo de retención, los picos presentes en los cromatogramas podrían corresponder al glicerol y ácido láctico. Si bien en el marco de esta tesina no fue confirmada la identidad de estos productos, para hacerlo se podría comparar el perfil de elución del sobrenadante con los estándares de glicerol y ácido láctico. Si el tiempo de retención de los picos del cromatograma correspondiente al sobrenadante coincide con el tiempo de retención de los picos presentes en la muestra que contenían glicerol y ácido

láctico, se confirmaría al menos en parte la identidad de los productos “secundarios”.

#### **7.1.1.2.1 Ácido láctico**

La presencia de ácido láctico en un cultivo de *S. cerevisiae* crecido en presencia de hexosas está usualmente asociada a la contaminación por bacterias fermentadoras ácido lácticas<sup>60,69</sup>. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en el marco de una pasantía efectuada por la estudiante Bach. Florencia Garabato en nuestro laboratorio, se verificó la ausencia de bacterias contaminantes en los cultivos de las distintas cepas y evoluciones obtenidas. Esto se desarrolló por medio de reacciones de PCR dirigidas a amplificar el gen 16S ARNr (presente únicamente en bacterias). Además, al final de cada ensayo se estrió una alícuota de cultivo en placas con medio YPD sin antibiótico y a las 24-48 hs se observó la presencia de colonias homogéneas iguales a las que exhibe típicamente *S. cerevisiae*, sin la presencia de colonias deferentes, ya sea en tamaño, forma o color lo que permitiría destacar la presencia de contaminación (datos no mostrados).

Sedlak y Ho (2004)<sup>70</sup> reportaron que en los sobrenadantes de cultivos fermentativos de hidrolizado lignocelulósico con *S. cerevisiae* hallaron productos como glicerol, etanol, xilitol y ácido láctico. De todas formas, Colombié y col. (2001)<sup>71</sup> afirman que durante la fermentación convencional de dicha levadura, sólo una pequeña parte de glucosa es convertida en ácido láctico.

Los efectos del ácido láctico en levaduras como *S. cerevisiae* no son buenos. Narendranath y col. (2003)<sup>72</sup> reportaron que un aumento de la concentración de ácido láctico en el medio provoca que la tasa de crecimiento de *S. cerevisiae* decrezca exponencialmente y que la duración de la fase de latencia (o fase *lag*) aumente en exponencialmente<sup>72</sup>. Como consecuencia, el consumo del azúcar y la producción de etanol se ven disminuidos. Lo mismo fue reportado por Ilmén y col. (2007)<sup>73</sup> los cuales además mencionaron varios artículos en los que se modificó genéticamente a *S. cerevisiae* para incrementar la producción de lactato, dando como resultado efectos negativos en la producción de etanol<sup>71,74,75</sup>. Además, afirman que dichos efectos de producción de ácido láctico son más pronunciados aún en medios con xilosa como única fuente de carbono que con glucosa<sup>73</sup>.

Por otro lado, Ding y col. (2009)<sup>76</sup> detectaron y cuantificaron un total de 143 y 128 metabolitos intracelulares en *S. cerevisiae* en fermentaciones continuas y discontinuas respectivamente. Los niveles de algunos metabolitos implicados en el metabolismo central de carbono o en otras vías metabólicas variaron significativamente a lo largo de ambos procesos. El glicerol y el ácido fosfórico fueron los principales componentes en la fermentación continua, mientras que el ácido láctico y el glicerol, de la fermentación discontinua<sup>76</sup>.

Si bien en el marco de esta tesina no se determinó el contenido intracelular de las levaduras, todos los ensayos de producción realizados se relacionan con el modelo de fermentación discontinua en el cual el sustrato se proporciona al comienzo del proceso sin la adición o eliminación del medio hasta el final del ensayo; a diferencia de la fermentación continua en la cual la adición y extracción de medio de cultivo es constante en un bio-reactor que contiene los microorganismos<sup>77</sup>. De acuerdo a lo descrito por Ding y col. (2009)<sup>76</sup>, se podría especular sobre posibles alteraciones del metabolismo de xilosa. Siguiendo esta línea de pensamiento, en futuras investigaciones podríamos analizar tanto sobrenadante como contenido celular para abarcar de manera más global todos los productos presentes.

Particularmente, el ácido láctico se detectó únicamente en los sobrenadantes de las cepas que contenían el plásmido pRS42K::XI. Esto quizás podría deberse a que la expresión del gen *xylA* presente en el plásmido, permite que la asimilación de xilosa genere intermediarios, incluyendo ácido láctico como producto de fermentación. Otra razón posible, aunque menos probable, es que el plásmido en sí mismo tenga algún componente que lleve a la producción de ácido láctico. Para verificar esta hipótesis habría que transformar la levadura CAT-1-XIT con el plasmido pRS42K sin el gen *xylA* y repetir este ensayo.

#### **7.1.1.2.2 Glicerol**

Sólo se detectó glicerol en el sobrenadante del cultivo de CAT-1-XIT (pRS42K::XI) 10ma evolución. Karimi y col. (2006)<sup>78</sup> reportaron que el glicerol es uno de los sub-productos más importantes de la fermentación de glucosa a etanol por parte de *Mucor indicus* y *S. cerevisiae*. En ese trabajo determinaron rendimientos de producción de glicerol de 117 y 90 mg/g respectivamente<sup>78</sup>. Como éste, hay muchos antecedentes que indican que el glicerol es un sub-producto muy

frecuente de la fermentación en *S. cerevisiae*<sup>76,79</sup>. Hay muchos estudios en los que se analiza el metabolismo de glicerol con detalle y de hecho, algunos de ellos han buscado alternativas para eliminar los genes de producción del mismo sin generar un desbalance redox<sup>11,80-84</sup>. Particularmente, Michnick y col. (1997)<sup>79</sup> mutaron (eliminandolo) el gen *GPD1* y lograron una disminución del 50% en la producción de glicerol que a su vez provocó un leve aumento en la producción de etanol.

### **7.1.1.3 Rendimiento de etanol**

Como se reportó en Resultados, el *pool* CAT-1-XIT (pRS42K::XI) 10<sup>ma</sup> evolución crecido en medio YP(1/5) con 20 g/L de xilosa exhibió un rendimiento de 0,40 g/g, determinado a las 72 hs de incubación. Cabe destacar que el valor teórico máximo de rendimiento de etanol para la vía xilosa isomerasa (la cual está presente en dicha cepa), es de 0,51 g/g<sup>50</sup>. De acuerdo con esto, el rendimiento determinado en nuestro ensayo fue muy bueno. De todas formas, hay que considerar que, si bien para calcular este rendimiento se utiliza los gramos de etanol obtenidos divididos los gramos de xilosa consumida, esos gramos de etanol producidos no son necesariamente producidos únicamente por el consumo de xilosa ni la xilosa consumida se utilizó solo para la producción de etanol. El medio YP(1/5) tiene tanto peptona como extracto de levadura y alguno de estos componentes podría estar siendo utilizado como fuente de carbono para producir etanol. Para descartar el aporte de estos componentes en la producción de etanol, realizamos un ensayo de control en el que se sembró la levadura en YP(1/5) sin xilosa y medimos el etanol producido. La cantidad de etanol obtenida fue despreciable, por lo que estimamos que el rendimiento calculado no está sobre-estimado.

Por otro lado, la xilosa consumida puede ser utilizada para la producción de biomasa o de algún sub-producto como por ejemplo glicerol.

Además, probablemente, parte de la xilosa consumida se esté utilizando para la producción de glicerol, lo cual explica en parte que no se haya alcanzado el rendimiento teórico máximo<sup>11</sup>. De hecho, Kuyper y col. (2003)<sup>60</sup> reportaron que durante el crecimiento anaeróbico de *S. cerevisiae*, el flujo de glicerol representó aproximadamente el 8% del flujo de etanol<sup>60</sup>.

Por otro lado, dicho rendimiento de etanol fue similar al de cepa RWB202-AFX (Tabla 1), la cual en 120 horas alcanzó un rendimiento de etanol de 0.42 g/g con 20 g/L de xilosa inicial, produciendo 8.6 g/L de etanol. Dicha cepa también contiene un plásmido de alto número de copias que porta el gen *xylA* de *Piromyces* sp.

Por otro lado, la cepa H158(pMA9) (Tabla 1), contiene el gen *xylA* de *T. thermophilus* en un plásmido. La cepa fue cultivada en presencia de 30 g/L de xilosa, alcanzó un rendimiento de 0,125 g/g en 110 horas, mucho menor que el de CAT-1-XIT(pRS42K::XI) evolucionada. Probablemente esta diferencia se pueda deber, entre otras cosas, a que el gen *xylA* de la cepa H158(pMA9) es de origen bacteriano, mientras que las cepas CAT-1-XIT (pRS42K::XI) evolucionada y RWB202-AFX tienen el gen *xylA* del hongo *Piromyces* sp. y, como se mencionó en la Introducción, hay algunos estudios que afirman que la expresión de una enzima bacteriana funcional en un eucariota (como la levadura) es menos probable que la expresión funcional de una enzima de origen eucariota<sup>15</sup>.

### **7.1.2 Evaluación del crecimiento y consumo de xilosa a las 72 horas de incubación de CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10<sup>ma</sup> evolución en presencia de diferentes concentraciones de xilosa.**

En base a los resultados del ensayo anterior, se evaluó el consumo de xilosa y los productos generados a las 72 horas de incubación por CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10<sup>ma</sup> evolución cultivada en medio YP(1/5) con diferentes concentraciones iniciales de xilosa (32 g/L, 41 g/L, 38 g/L, 61 g/L, 68 g/L, 80 g/L).

Como se mencionó en Resultados, en los distintos cultivos no se hallaron diferencias significativas en el consumo de xilosa, concentración de etanol y biomasa producida. Esto no concuerda con lo esperado, ya que en teoría, a mayor concentración inicial de azúcar debería alcanzarse mayor consumo de xilosa y producción de etanol.

Además, el rendimiento de producción de etanol de los diferentes cultivos abarcó valores desde 0.335 g/g para el cultivo con 32 g/L hasta 0.247 g/g para el cultivo con 80 g/L. Estos valores son muy bajos en comparación con los valores obtenidos en el cultivo anterior y en las cepas TMB 3066, TMB 3057 y TMB 3400 reportadas

en la literatura, las cuales presentaron un rendimiento de 0,43, 0,34 y 0,33 en un medio de cultivo con 100 g/L de xilosa (Tabla 1). Sin embargo, la cepa BY4741X que contiene en su genoma los genes de la vía oxo-reductiva de *S. stipitis* presentó un rendimiento de 0,279 g/g (Tabla 1). Probablemente, estos valores de rendimientos tan bajos sean consecuencia de que la xilosa está siendo consumida para producir biomasa u otro producto (por ejemplo: glicerol). Si bien en Resultados vimos que, por ejemplo, el cultivo que contenía 80 g/L de xilosa inicial y que a las 72 horas consumió 37 g/L de xilosa (quedando con 43 g/L de xilosa final) fue el que presentó menor concentración de glicerol en el sobrenadante; cabe recordar que no necesariamente fue el cultivo que menor cantidad de glicerol produjo, sino el que menor cantidad expulsó al medio. Esto es debido a que a mayor hipertonidad en el medio, mayor concentración de glicerol intracelular<sup>11</sup>. De hecho, tendría sentido que a mayor concentración de xilosa inicial, mayor hiperosmolaridad y por tanto, mayor producción de glicerol para contrarrestar dicho efecto. Una forma de verificar esto sería realizando un lisado celular y analizar los metabolitos internos de las levaduras.

Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas en los valores de producción de etanol y consumo de xilosa para todos los medios, podría deberse a razones intrínsecas a: el organismo, al protocolo utilizado, a la presencia de un nutriente limitante del medio utilizado o a una combinación de estas. Entre las razones intrínsecas al organismo existen dos alternativas, una de ellas podría ser que el crecimiento de la levadura se ve inhibido por las altas concentraciones iniciales de azúcar y la otra razón podría deberse a que la concentración de etanol en el medio supera lo que la levadura puede tolerar, inhibiendo su crecimiento. Ambas razones están relacionadas con el estrés hiperosmótico. Por otro lado, podría deberse a fallos en el tiempo de muestreo, quizás 72 horas de crecimiento no fueron suficientes para que las levaduras llegaran a su máximo de producción de etanol. Para definir cuándo es el auge de producción de etanol de las mismas se realizó el perfil de crecimiento de la cepa CAT-1-XIT(pRS42k::XI) 10<sup>ma</sup> evolución, obteniendo medidas de consumo de xilosa y producción de etanol cada 12 horas durante 11 días. Dicho perfil se discutirá más adelante.

### **7.1.2.1 Glicerol**

Si bien no se construyó una curva de calibración para determinar la concentración de glicerol, como se mencionó en Materiales y Métodos, observando las áreas de los picos del cromatograma por HPLC, se puede estimar que cuanto menor es la concentración de xilosa final, mayor es la concentración de glicerol en el medio.

La exposición de las levaduras a una presión osmótica elevada, debido a la concentración de azúcar inicial, provoca un rápido aumento del potencial osmótico dentro de la célula (como resultado de la salida de agua), así como una disminución del volumen celular. La respuesta de levadura es desencadenar una amplia regulación génica, lo que lleva a la producción de una gama de compuestos protectores, entre ellos el glicerol. Como se mencionó en la Introducción, el glicerol actúa como un soluto compatible para contrarrestar la presión osmótica y se sintetiza a través de la expresión de la vía de alta osmolaridad de glicerol (HOG)<sup>85</sup>. Esta teoría podría explicar los resultados obtenidos. El aumento de glicerol en el medio puede estar relacionado a que el mismo comienza a difundir a través de la membrana, debido a que la hipertonicidad del medio disminuye (por el consumo de azúcar por parte de las levaduras). Siguiendo esta línea de pensamiento, probablemente la ausencia de glicerol en otros medios no se trate de la ausencia de producción del mismo, sino de la retención por parte de la levadura debido a que la concentración de xilosa en el medio no disminuyó lo suficiente para dejar de ser hipertónico. Alternativamente, el glicerol excretado puede simplemente generarse por el balance metabólico de la levadura en esas condiciones de cultivos.

### **7.1.3 Perfil de crecimiento, consumo de xilosa y producción de etanol de la cepa CAT-1-XIT(pRS42K:XI) 10<sup>ma</sup> evolución.**

Se determinó el perfil de crecimiento y la producción de etanol de CAT-1-XIT(pRS42K:XI) 10<sup>ma</sup> evolución en caldo YP(1/5) con 55 g/L de xilosa.

Como se mencionó en Resultados, se observó que a partir de las 48 horas hasta el final del ensayo, el descenso de la concentración de xilosa se corresponde con un aumento en la concentración de etanol. Si bien a las 72 horas el cultivo parecería no haber llegado a su máximo de producción de etanol, dicha producción luego de 11 días fue de 12,58 g/L (valores similares obtenidos en el ensayo anterior).

### **7.1.3.1 Factores que pueden influir en la producción de bioetanol**

Hay muchos factores que pueden influir en la producción de bioetanol, destacándose, la temperatura, concentración de azúcar, pH, tiempo de fermentación, velocidad de agitación y tamaño del inóculo<sup>77</sup>. Los factores como temperatura y velocidad de agitación utilizados durante esta tesina coinciden con los “óptimos” reportados para *Saccharomyces cerevisiae*<sup>77</sup>. De todas formas, cabe aclarar que la cepa reportada en este artículo no es la misma cepa de este estudio, por lo que, para estar seguros de que estas condiciones son las óptimas para nuestra cepa deberíamos ponerlas a punto. Por otro lado, la concentración de azúcar, tamaño del inóculo, pH y tiempo de fermentación no son necesariamente los óptimos, debido a que no se realizó la puesta a punto de dichas condiciones. El tiempo afecta la fermentación; ya que tiempos de fermentación cortos causan que la misma sea ineficiente a causa del escaso crecimiento de los microorganismos. Por otro lado, un tiempo de fermentación más prolongado (especialmente en modo discontinuo o *batch*) genera un efecto tóxico sobre el crecimiento microbiano debido a la alta concentración de etanol en el caldo fermentado<sup>77</sup>.

Un valor de etanol de 12,5 g/L apunta a que, como se mencionó anteriormente, hay razones intrínsecas a la levadura que no permiten una mayor producción de etanol.

#### **7.1.3.1.1 Inhibición debido a elevadas concentraciones de azúcar**

Mohd y col. (2017)<sup>77</sup> reportaron que la concentración de azúcar inicial es un factor importante en la producción de etanol. Altas concentraciones iniciales de glucosa pueden inhibir la utilización la misma, provocando una disminución del crecimiento celular y de la eficiencia de fermentación para producir etanol<sup>86</sup>. Además, el uso de una concentración excesiva de azúcar causa una tasa de absorción de azúcar constante, debido a que la concentración de azúcar está por encima de la capacidad de absorción de las células microbianas. Si bien se puede aspirar a una alta productividad y rendimiento de etanol en la fermentación utilizando una concentración inicial de azúcar más alta, esto conlleva mayor tiempo de fermentación y costos de recuperación; a menos que el aumento de concentración de azúcar inicial se vea acompañado con un aumento del inóculo.

A pesar de que en este ensayo no se utilizaron concentraciones muy elevadas de azúcar, es posible que la levadura no tenga suficientes transportadores de xilosa y se sature frente a las concentraciones empleadas en nuestro ensayo. Para evitar este efecto, se podrían insertar más copias del gen *Gal2* mutado para el transporte único de xilosa o se podría inocular los medios con un mayor número de células.

De todas formas Mohd y col. (2017) reportaron que la tasa máxima de producción de etanol sin inhibición con glucosa como sustrato se logra cuando se usan azúcares a una concentración de 150 g/L<sup>77</sup>. Como nuestro ensayo se hizo a menores concentraciones, probablemente no haya inhibición por concentración de sustrato. De hecho, este ensayo no presentó diferencias significativas en valores de biomasa, producción de etanol ni consumo de xilosa a pesar de comenzar con diferentes concentraciones iniciales de azúcar.

#### **7.1.3.1.2 Inhibición de crecimiento debido la cantidad de etanol producida**

Elevadas concentraciones de etanol durante la fermentación pueden causar inhibición de crecimiento y disminución de la viabilidad de las levaduras. La incapacidad de *S. cerevisiae* de crecer en un medio que contiene gran cantidad de alcohol lleva también a la inhibición en la producción de etanol<sup>77</sup>. Dado que el rango de concentración en todos los ensayos llega a un máximo de producción de etanol de aproximadamente 12 g/L independientemente de la concentración inicial de xilosa, todo parece apuntar a que la concentración de etanol es la principal contribuyente a la osmolalidad extracelular durante la fermentación, generando una barrera limitante a la hora de producir etanol. Sin embargo, se han realizado ensayos donde cepas de *S. cerevisiae* (BCRC 21812) utilizadas industrialmente para la producción de etanol a partir de 260 g/L de glucosa han obtenido 115 g/L de etanol<sup>86</sup>. Si bien no es la misma cepa que nuestro estudio, hay cepas de *S. cerevisiae* capaces de tolerar concentraciones mayores a 12 g/L de etanol. De hecho, en un estudio publicado por Santos y col (2017) la cepa CAT-1 produjo más de 20 g/L de etanol a partir de 50 g/L de glucosa aproximadamente sin inconvenientes<sup>87</sup>. Por otro lado, Montipó y col (2018) reportaron que la cepa CAT-1 produjo 42,25 g/L de etanol con un rendimiento de 0,38 g/g en 72 horas sin problema de inhibición por sustrato ni por producto<sup>88</sup>.

En síntesis considerando todo lo expuesto y analizando la información recopilada, se concluyó que los datos reunidos son insuficientes para determinar el factor limitante de la fermentación por parte de la cepa CAT-1-XIT (pRS42K::XI). Probablemente, para esto sería necesario realizar ensayos de metabolómica detallada sobre los procesos que ocurren durante la fermentación para determinar si la baja de producción de etanol se debe a la presencia de un nutriente limitante en el medio o a otra causa (como por ejemplo algún desequilibrio metabólico).

### **7.1.3.2 Rendimiento y productividad de etanol**

Como se mencionó en Resultados, el rendimiento específico de etanol fue de 0.47 g/g. Este valor se calculó a partir de que el consumo de xilosa se observó acompañado de la producción de etanol (48 horas de iniciado el cultivo). Sin embargo, el rendimiento global de etanol fue más bajo (0.31 g/g). Estos resultados indicarían a que en las primeras 48 horas la xilosa estaría siendo utilizada para la producción de glicerol o biomasa además de la producción de etanol.

Por otro lado, la productividad de etanol del proceso también fue muy baja (0.095 g/L\*h), probablemente debido a la extensa fase *lag* en las primeras 48 hs del cultivo. Mohd y col (2017)<sup>77</sup> reportaron que el aumento en la concentración celular inicial (inóculo) reduce el tiempo de fermentación, ya que se parte de un número celular elevado, capaz de consumir una cantidad considerable de azúcar y por tanto producir etanol rápidamente<sup>77</sup>. Probablemente, la fase *lag* extensa puede generarse como consecuencia de una baja concentración celular del inóculo. Esto determina que el primer período del perfil de crecimiento esté destinado a la producción de biomasa y no a la producción de etanol. Además, cabe recordar que probablemente en las primeras 48 horas, la cantidad de O<sub>2</sub> sea mayor, y si bien *S. cerevisiae* es capaz de fermentar en presencia de O<sub>2</sub>, probablemente lo haga con menor rendimiento. Otro factor que pudo haber influido en el aumento de la fase *lag* es que el cultivo primario utilizado para obtener las células y realizar los ensayos de producción fue en caldo YPD, el cual contiene glucosa como fuente principal de carbono. Esto se debe a que para que la cepa crezca en dicho medio tiene que expresar los genes de asimilación de glucosa. Realizar el pasaje de estas células a YPX, con xilosa como fuente principal de carbono, implica una reestructuración de la expresión génica de las levaduras, en la cual se detendría la

expresión de parte de la vía glicolítica y el metabolismo se reordenaría para enfocarse en la asimilación de xilosa a través de la vía PPP. Seguramente, este período de “adaptación” de las células a este nuevo medio coincide con la fase *lag*. Por último, como se mencionó anteriormente, otro motivo causante de la extensión de dicha fase podría ser la presencia de ácido láctico, el cual se produce a medida que el cultivo crece provocando efectos inhibitorios en el crecimiento de las levaduras.

En cuanto a la producción de glicerol, en este ensayo se observó que a medida que la cepa consume xilosa, la concentración de glicerol en el medio aumenta, lo que podría indicar que el mismo, que habría sido acumulado intracelularmente al principio del cultivo para aliviar el stress osmótico, comienza a difundir a través de las células a medida que la xilosa y la hipertonicidad del medio de cultivo van disminuyendo. A su vez, la producción de glicerol podría estar acoplada o relacionada con la producción de etanol y ser utilizada para aliviar el desbalance metabólico causada por la sobreexpresión de una ruta heteróloga para el consumo de xilosa. De hecho, como se mencionó en la Introducción, la formación de glicerol también se relaciona con la oxidación del NADH<sup>32</sup>. Para esto, la fermentación de xilosa en etanol requeriría la conversión de una molécula de triosa fosfato a glicerol por cada molécula de xilosa metabolizada. El problema es que no se puede metabolizar suficiente triosa fosfato para producir etanol, dando como resultado una escasez de ATP. Por lo cual, el ATP también podría ser un factor limitante de la fermentación.

## **7.2 Reflexiones finales**

Los biocombustibles de segunda generación pueden contribuir significativamente a solucionar la demanda de energía en un futuro; sin embargo, el costo del proceso es una barrera importante para su producción comercial en un mediano a corto plazo. El costo del etanol celulósico es dos o tres veces más alto que el precio actual de la gasolina en una base equivalente de energía. El costo medio del biodiesel producido a partir de microalgas, una materia prima prospectiva, es al menos siete veces más alto que el precio actual del diesel. La proporción de materia prima en los costos totales es relativamente menor (30-50%) en el caso de los biocombustibles de segunda generación en comparación con los biocombustibles

de primera generación, en los que la materia prima representa más de dos tercios de los costos totales. Si bien se necesitan reducciones de costos significativas tanto para bioetanol como biodiesel de segunda generación, las barreras críticas se encuentran a diferentes niveles del proceso de producción. Para el etanol celulósico, los costos de conversión de la biomasa deben reducirse, mientras que para el biodiesel de segunda generación, el costo de la materia prima es el principal problema<sup>2</sup>.

Por otra parte, se sabe que las algas producen biomasa más rápido y en una superficie reducida, en comparación con la biomasa lignocelulósica. Sin embargo, la producción de biomasa de algas presenta desafíos técnicos tales como la extracción de lípidos y la deshidratación, así como los desafíos geográficos en áreas de clima frío como Canadá, donde la temperatura está por debajo del punto de congelación durante gran parte del año<sup>1</sup>.

La producción de etanol a partir de diferentes fuentes de carbono por varios microorganismos salvajes o modificados por ingeniería genética y la producción de alcoholes como 1-butanol, isobutanol, isopropanol, *etc.*, como combustibles alternativos al etanol, han sido estudiados<sup>9</sup>. También se ha estudiado la producción de biodiesel (combustible derivado de ácidos grasos) como otra alternativa<sup>9</sup>. Para mejorar la productividad y el rendimiento de estos biocombustibles, se han analizado diversos microorganismos y rutas metabólicas relacionadas a la producción de cada biocombustible. De hecho, parece imposible establecer una estrategia común que funcione para todo tipo de biocombustible ya que las rutas metabólicas involucradas dependen directamente del organismo y de la materia prima que se utilice para su producción; además otros aspectos como disponibilidad de materia prima, zona geográfica de producción y clima también influyen en la estrategia a utilizar<sup>9</sup>.

Todo esto en conjunto nos permite entender que el futuro de los biocombustibles no puede depender de la utilización de biocombustibles de una única generación ni de un tipo de biocombustible (biodiesel, etanol, butanol, *etc.*), sino que debe ser una combinación de las tres generaciones para hacer frente al aumento de la demanda mundial como resultado del agotamiento de los recursos petroleros del mundo.

## 8 CONCLUSIÓN

---

Se logró construir una cepa modificada de *S. cerevisiae* capaz de producir etanol como producto mayoritario de la fermentación de xilosa a través de la vía de isomerización. Dicha cepa contiene en su genoma el gen *xylA* de *Streptomyces coelicolor* y además el plásmido multicopia con el gen *xylA* de *Piromyces* sp. Si bien, la productividad y el rendimiento de etanol no fueron los mejores, quedan muchas alternativas para mejorar ambos valores (especificadas en perspectivas).

## 9 PERSPECTIVAS

---

El proceso de fermentación puede realizarse de modo continuo o discontinuo. El modo discontinuo, tiene beneficios como la esterilidad completa, fácil administración de materia prima y no requiere de mano de obra constante. Sin embargo, la productividad del proceso es baja y requiere de costos de mano de obra elevados. Además, la presencia de altas concentraciones de azúcar puede resultar en la inhibición por sustrato como se mencionó en la discusión. Por otro lado, en la fermentación continua, el volumen del cultivo debe ser constante y los productos de fermentación se extraen continuamente del medio. Las ventajas del sistema continuo son: mayor productividad, menores volúmenes de bio-reactores y menores costos de inversión y operación. A una tasa de dilución alta, la productividad de etanol aumenta, mientras que el rendimiento de etanol disminuye debido al consumo incompleto de sustrato por las levaduras (si el tiempo de extracción de medio utilizado es corto). Sin embargo, la posibilidad de contaminación es mayor que otros tipos de fermentación<sup>77</sup>.

Por estas razones, una perspectiva posible sería realizar ensayos de fermentación en un modo continuo que, en teoría, permitiría sortear los problemas de: producción de glicerol, inhibición por sustrato e inhibición por producto (etanol y ácido láctico).

Otra perspectiva posible sería optimizar las condiciones de cultivo para obtener mayor cantidad de etanol:

- Aumentando la concentración inicial del inóculo.

- Realizando ensayos de optimización del medio variando la concentración de los componentes del mismo.

Por otro lado, se podría realizar ensayos utilizando mezclas de glucosa-xilosa, ya que a nivel industrial en los medios hay mezclas de estos dos azúcares.

Además, se podría aislar una cepa del *pool* CAT XIT (pRS42K::XI) del cultivo de la décima evolución, utilizando como criterio aquella que presente la mejor “*performance*” en cuanto a producción y rendimiento de etanol. Con dicha cepa se podrían realizar ensayos de producción de etanol a partir de hidrolizado lignocelulósico con los medios de cultivo que se estén utilizando a nivel industrial.

El uso de antibióticos (necesario para asegurar el mantenimiento del plásmido) no es deseable en la industria por rentabilidad y contaminación ambiental. Para evitarlo, se podrían incorporar múltiples copias del gen *xylA* de *Piromyces* sp. a nivel cromosomal. A su vez, dichas incorporaciones podrían ser sobre los genes PHO13, APJ1 y XYL2. Mutar el gen PHO13<sup>15</sup> incrementa la producción de etanol. De hecho, la cepa BY4741X/ $\Delta$ PHO13 luego de esta mutación aumentó su rendimiento de etanol de 0,276 a 0,357 g/g (Tabla 1)<sup>51</sup>. APJ1<sup>89</sup> codifica para una chaperona de la degradación de proteínas mediada por SUMO, Swinnen y col (2015) reportaron que su depleción resulta en levaduras más resistentes a la concentración de etanol. Por último, la expresión del gen XYL2 (de la vía oxo-reductiva) sería inútil, ya que la vía oxo-reductiva está inhibida por la eliminación del gen GRE3 en la cepa CAT XIT( pRS42K::XI).

También sería conveniente realizar ensayos de metabolómica, donde se identifiquen todos los metabolitos presentes tanto en el sobrenadante como dentro de la célula, para estudiar todas las vías que se encuentran activas durante la fermentación y así identificar el factor limitante de dicho proceso.

Por último, se podría analizar el genoma completo de la cepa con mejor “*performance*” aislada del *pool* de la décima evolución de CAT-1-XIT(pRS42K::XI) y de la cepa CAT-1-XIT(pRS42K::XI) sin evolucionar para ver qué mutaciones son las

que se generaron en el proceso de evolución. Además sería interesante analizar por RNAseq los perfiles de expresión de los genes de dichas cepas.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

---

1. Lee, R. A. & Lavoie, J.-M. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers* **3**, 6–11 (2013).
2. Carriquiry, M. A., Du, X. & Timilsina, G. R. Second generation biofuels: Economics and policies. *Energy Policy* **39**, 4222–4234 (2011).
3. Statistic. Statista (2017) Fuel ethanol production in major countries (2017).
4. Lavoie, J.-M., Beauchet, R., Berberi, V. & Chornet, M. Biorefining Lignocellulosic Biomass via the Feedstock Impregnation Rapid and Sequential Steam Treatment. *Biofuel's Engineering Process Technology* **32** (2011).
5. Cherubini, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management* **51**, 1412–1421 (2010).
6. Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K. & Dalai, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**, 578–597 (2010).
7. Wei, N., Quarterman, J., Kim, S. R., Cate, J. H. D. & Jin, Y.-S. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. *Nature Communications* **4**, (2013).
8. Prinsen, P. Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Trabajo final de maestría. Universidad de Sevilla. (2010)
9. Kang, A. & Lee, T. S. Converting Sugars to Biofuels: Ethanol and Beyond. *Bioengineering* **2**, 184–203 (2015).
10. Salusjärvi, L., Pirkänen, J.-P., Aristidou, A., Ruohonen, L. & Penttilä, M. Transcription Analysis of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Novel Responses to Xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **128**, 37 (2006).
11. Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J. M. & Prior, B. A. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 4135–4144 (1994).
12. Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T. & Sawayama, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**, 37–53 (2009).
13. Zhou, H., Cheng, J., Wang, B. L., Fink, G. R. & Stephanopoulos, G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* **14**, 611–622 (2012).
14. Malán, A.K., Fagundez, A., Batista, B.S. Engineering Hemicellulose-Derived Xylose Utilization in *Saccharomyces cerevisiae* for Biotechnological Applications, Microbial models: from environmental to industrial sustainability, *Microorganisms for Sustainability* **41**-56 (2016).
15. Kwak, S. & Jin, Y.-S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. *Microbial Cell Factories* **16**, (2017).

16. Luyten, K., Riou, C. & Blondin, B. The hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* play different roles during enological fermentation. *Yeast* **19**, 713–726 (2002).
17. Moysés, D., Reis, V., Almeida, J., Moraes, L. & Torres, F. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 207 (2016).
18. Farwick, A., Bruder, S., Schadeweg, V., Oreb, M. & Boles, E. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 5159–5164 (2014).
19. Weierstall, T., Hollenberg, C. P. & Boles, E. Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Molecular Microbiology* **31**, 871–883 (1999).
20. Katahira, S. *et al.* Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter Sut1. *Enzyme and Microbial Technology* **43**, 115–119 (2008).
21. Young, E. M., Comer, A. D., Huang, H. & Alper, H. S. A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* **14**, 401–411 (2012).
22. Hector, R. E., Qureshi, N., Hughes, S. R. & Cotta, M. A. Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**, 675–684 (2008).
23. Weimberg, R. Pentose Oxidation by *Pseudomonas fragi*\*. *The journal of biological chemistry* **236**, 8 (1960).
24. Rolin, A. S. D. & A. Stephen Dahms, N. 3-droxy-D- pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **60**, 7 (1974)..
25. Stephens, C. *et al.* Genetic Analysis of a Novel Pathway for D-Xylose Metabolism in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology* **189**, 2181–2185 (2007).
26. Jeffries, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology* **17**, 320–326 (2006).
27. Bettiga, M., Hahn-Hägerdal, B. & Gorwa-Grauslund, M. F. Comparing the xylose reductase/xylytol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology for Biofuels* **1**, 16 (2008).
28. Chiang, C. & Knight, S. G. d-Xylose metabolism by cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **35**, 454–463 (1959).
29. Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C. F. & Hahn-Hägerdal, B. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3381–3386 (2000).
30. Harhangi, H. R. *et al.* Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces sp.* strain E2 follows the bacterial pathway. *Archives of Microbiology* **180**, 134–141 (2003).
31. Van Vleet, J. & Jeffries, T. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Current Opinion in Biotechnology* **20**, 300–306 (2009).

32. Bruinenberg, P. M., Bot, P. H. M., Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **18**, 287–292 (1983).
33. Xiong, M., Chen, G. & Barford, J. Alteration of xylose reductase coenzyme preference to improve ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* from high xylose concentrations. *Bioresource Technology* **102**, 9206–9215 (2011).
34. Walfridsson, M., Anderlund, M., Bao, X. & Hahn-Hägerdal, B. 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**, 218–224 (1997).
35. Sarthiy, A. V. & Hall, B. D. Expression of the Escherichia coli Xylose Isomerase Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 5 (1987).
36. Amore, R., Wilhelm, M. & Hollenberg, C. P. The fermentation of xylose ?an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**, 351–357 (1989).
37. Catharine J. Moes, Isak S. Pretorius and Willem H. van Zyl. Cloning and expression of the clostridium thermosulfurogenes d-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters*. pp 269-274.(1996).
38. Brat, D., Boles, E. & Wiedemann, B. Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 2304–2311 (2009).
39. Walfridsson, M., Anderlund, M., Low, L. B. & Gerdal, R. H.-H. Ethanolic Fermentation of Xylose with *Saccharomyces cerevisiae* Harboring the *Thermus thermophilus* xylA Gene, Which Expresses an Active Xylose (Glucose) Isomerase. **62**, 4 (1996).
40. Kuyper, M., Winkler, A., Vandijken, J. & Pronk, J. Minimal metabolic engineering of for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Research* **4**, 655–664 (2004).
41. Bengtsson, O., Hahn-Hägerdal, B. & Gorwa-Grauslund, M. F. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* **2**, 9 (2009).
42. Karhumaa, K., Sanchez, R. G., Hahn-Hägerdal, B. & Gorwa-Grauslund, F. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant. *Microbial Cell Factories* **10** (2007).
43. Attaché Reports (GAIN. USDA. EU-28: Biofuels Annual. *United States Department of Agriculture* (2018).
44. Attaché Reports. GAIN. Colombia: Biofuels Annual. *United States Department of Agriculture* (2018).
45. Attaché Reports. GAIN. Russia: Wood Pellet Production Update. *United States Department of Agriculture* (2018).
46. Etanol de segunda geração poderá ser economicamente viável a partir de 2025 | AGÊNCIA FAPESP. Available at: <http://agencia.fapesp.br/etanol-de-segunda-geracao-podera-ser-economicamente-viavel-a-partir-de-2025/26272/>. (Accessed: 31st July 2018)
47. Etanol de segunda geração poderá ser economicamente viável a partir de 2025. Available at: <https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/etanol-segunda-geracao-economicamente-viavel-290917/>. (Accessed: 31st July 2018)

48. Etanol de segunda geração poderá ser economicamente viável a partir de 2025. Available at: <http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1156017>. (Accessed: 31st July 2018)
49. Lee, Tae-hee, Min-young Kim, Yeon-Woo Ryu, Jin-ho Seo. Estimation of Theoretical Yield for Ethanol Production from D-Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Using Metabolic Pathway Synthesis Algorithm. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 441-744. (2001)..
50. Lee, S.-M., Jellison, T. & Alper, H. S. Directed Evolution of Xylose Isomerase for Improved Xylose Catabolism and Fermentation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 5708–5716 (2012).
51. Fujitomi, K., Sanda, T., Hasunuma, T. & Kondo, A. Deletion of the PHO13 gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. *Bioresource Technology* **111**, 161–166 (2012).
52. Babrzadeh, F. *et al.* Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. *Molecular Genetics and Genomics* **287**, 485–494 (2012).
53. Guldener, U. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research* **24**, 2519–2524 (1996).
54. *Strain engineering: methods and protocols*. (Humana ; Springer, 2011).
55. Gueldener, U. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research* **30**, 23e – 23 (2002).
56. Taxis, C. & Knop, M. System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*. *BioTechniques* **40**, 73–78 (2006).
57. Bertani, G. Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia Coli*. **62**, 8 (1951).
58. *Yeast metabolic engineering: methods and protocols*. **1152**, (Humana Press, 2014).
59. Belén Fernández. Ensayo de dos estrategias de expresión de genes heterólogos implicados en la metabolización de xilosa en *Saccharomyces cerevisiae*. (2018).
60. Kuyper, M. *et al.* High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Research* **4**, 69–78 (2003).
61. Ausubel, F.M. *Short protocols in molecular biology Second Edicion*. (Greene publishing associates , Inc. and Jhon Wiley and Sons, Inc., 1992).
62. Fritsch, E; Sambrook, J; Maniatis, T. *Molecular cloning a laboratory manual second edition*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
63. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870–1874 (2016).
64. Gietz, D., Jean, A. S., Woods, R. A. & Schiestl, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* **20**, 1425–1425 (1992).
65. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W.(2008). InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

66. Morris, G. J., Winters, L., Coulson, G. E. & Clarke, K. J. Effect of Osmotic Stress on the Ultrastructure and Viability of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **132**, 2023–2034 (1986).
67. dos Santos, L. V. *et al.* Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Scientific Reports* **6**, (2016).
68. Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C. & Piškur, J. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research* **14**, 826–832 (2014).
69. Hohl, L. A. & Joslyn, M. A. Lactic Acid Formation In alcoholic fermentation by yeast. *Plant Physiology* **16**, 343–360 (1941).
70. Sedlak, M. & Ho, N. W. Y. Production of Ethanol from Cellulosic Biomass Hydrolysates Using Genetically Engineered *Saccharomyces* Yeast Capable of Cofermenting Glucose and Xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **113**, 14 (2004).
71. Colombié, S., Dequin, S. & Sablayrolles, J. . Control of lactate production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a bacterial LDH gene. *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 38–46 (2003).
72. Narendranath, N. V., Thomas, K. C. & Ingledew, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **26**, 171–177 (2001).
73. Ilmen, M., Koivuranta, K., Ruohonen, L., Suominen, P. & Penttila, M. Efficient Production of L-Lactic Acid from Xylose by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 117–123 (2007).
74. Skory, C. D. Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **30**, 22–27 (2003).
75. Ishida, N. *et al.* Efficient Production of L-Lactic Acid by Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a Genome-Integrated L-Lactate Dehydrogenase Gene. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1964–1970 (2005).
76. Ding, M.-Z., Cheng, J.-S., Xiao, W.-H., Qiao, B. & Yuan, Y.-J. Comparative metabolomic analysis on industrial continuous and batch ethanol fermentation processes by GC-TOF-MS. *Metabolomics* **5**, 229–238 (2009).
77. Mohd Azhar, S. H. *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports* **10**, 52–61 (2017).
78. Karimi, K., Emtiazi, G. & Taherzadeh, M. J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 138–144 (2006).
79. Michnick, S., Roustan, J.-L., Remize, F., Barre, P. & Dequin, S. Modulation of Glycerol and Ethanol Yields During Alcoholic Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* Strains Overexpressed or Disrupted for GPD1 Encoding Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase. *Yeast* **13**, 783–793 (1997).
80. Lages, F. & Lucas, C. Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemica et Biophysica Acta*. 8-18 (1997).
81. Ferreira, C. *et al.* A Member of the Sugar Transporter Family, Stl1p Is the Glycerol/H<sup>+</sup> Symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 2068–2076 (2005).

82. Klein, M., Swinnen, S., Thevelein, J. M. & Nevoigt, E. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities: Glycerol catabolism in yeast. *Environmental Microbiology* **19**, 878–893 (2017).
83. Pérez-Torrado, R., Oliveira, B. M., Zemančíková, J., Sychrová, H. & Querol, A. Alternative Glycerol Balance Strategies among *Saccharomyces* Species in Response to Winemaking Stress. *Frontiers in Microbiology* **7**, (2016).
84. Silva-Graça, M., Lages, F. & Lucas, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology* **145**, 2577–2585 (1999).
85. Zhuang, S., Smart, K. & Powell, C. Impact of Extracellular Osmolality on *Saccharomyces* Yeast Populations during Brewing Fermentations. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **75**, 244–254 (2017).
86. Chang, Y.-H. *et al.* Enhancement of the Efficiency of Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* via Gradually Batch-Wise and Fed-Batch Increasing the Glucose Concentration. *Fermentation* **4**, 45 (2018).
87. Santos, R. M. *et al.* Quantitative proteomic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains CAT-1 and PE-2. *Journal of Proteomics* **151**, 114–121 (2017).
88. Montipó, S. *et al.* Integrated production of second generation ethanol and lactic acid from steam-exploded elephant grass. *Bioresource Technology* **249**, 1017–1024 (2018).
89. Swinnen, S. *et al.* Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. *Genome Research* **22**, 975–984 (2012).

## 11 ANEXO

---

### 11.1 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 11.1.1 Medios de cultivo

\*En todos los medios la fuente de carbono se prepara previamente en una solución Stock 200 g/l autoclavada y se agrega en el momento de uso del medio. El agar se utilizó en una concentración de 16 g/L.

##### 11.1.1.1 Medio LB Modificado

Extracto de levadura	3 g/L
Bactotripton	5 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Agua destilada	c.s.p. 1L

##### 11.1.1.2 Medio MM

Extracto de levadura	1 g/L
Extracto de malta	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g/L
Xilosa	20 g/L
Agua destilada	c.s.p. 1L

##### 11.1.1.3 Medio YPD

Extracto de levadura	10 g/L
Peptona bacteriológica	20 g/L
Glucosa	20 g/L
Agua destilada	c.s.p. 1L

#### **11.1.1.4 Medio YPX<sub>20 g/l</sub>**

Extracto de levadura	10 g/L
Peptona bacteriológica	20 g/L
Xilosa	20 g/L
Agua destilada	c.s.p. 1L

#### **11.1.1.5 Medio YP(1/5)**

Extracto de levadura	2 g/L
Peptona bacteriológica	4 g/L
Agua destilada	c.s.p. 1L

La concentración de xilosa se indica en cada caso

### **11.1.2 Soluciones y buffers utilizados**

#### **11.1.2.1 5X LITE**

Acetato de litio	0,5 M
Tris-HCl pH 7,6	50 mM
EDTA	5 mM
Agua destilada	c.s.p. 1L

Se esteriliza en autoclave

#### **11.1.2.2 PEG LITE**

PEG<sub>200</sub> en 1X LITE hecho de 4 partes 50% PEG<sub>2000</sub> y 1 parte 5X LITE

### **11.1.2.3 Soluciones de lisis alcalina**

#### **11.1.2.3.1 Solución I**

Glucosa	50 mM
Tris HCl (pH8.0)	25 mM
EDTA (pH8.0)	10 mM
Agua destilada	c.s.p. 1L

Autoclavar, con pH final verificado

#### **10.1.2.4.2 Solución II**

NaOH 10M                      0.2 mL

SDS 10%                        1 mL

H<sub>2</sub>O ultrapura estéril        8.8 mL

Se prepara en el momento a partir de las soluciones *stock*

#### **11.1.2.3.2 Solución III**

Acetato de potasio            60 mL

Ácido acético glacial        11.5 mL

Agua ultrapura                28.5 mL

### **11.1.3 Herramientas moleculares**

#### **11.1.3.1 Electroforesis en gel de agarosa**

Los ensayos de electroforesis se efectuaron en geles de agarosa 1% (p/v) en buffer TAE 1X (45 mM *buffer* Tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8,0), en una en una cuba de electroforesis horizontal de la marca Labnet modelo E 1007-10 de 7x10 cm (EE. UU.). Las electroforesis se desarrollaron a 90 V por 1 hora aproximadamente. El ADN se visualizó bajo luz UV, ya que se utilizó como agente intercalante de ADN Good View (SBS, China) incorporado previamente en el gel (2 µL para 50 mL de gel).

En todos los casos se utilizó 5 µL del marcador molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder de Thermo Scientific (0.5 µg/µL).

#### **Agarosa 1% TAE 1X**

1. 0.5 g de Agarosa
2. 50 mL de TAE 1X (45mM buffer Tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8.0)
3. Calentar a potencia máxima 1 minuto en microondas
4. Enfriar y agregar 2 µL Good View (SBS, China)

## 12 APENDICE

### 12.1 RESULTADOS

#### 12.1.1 Evaluación de consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento.

**Tabla 4 Evaluación de consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento de las nueve cepas de estudio en medio YP(1/5)X.**

Cepas	Xilosa consumida (g/L)	Biomasa (g/L)	Etanol (g/L)	Y <sub>Biomasa/xilosa</sub> (g/g)	Y <sub>Etanol/xilosa</sub> (g/g)	Productividad (g/(L.h))
CAT-1-	1,50	0,500	0,20	0,332	0,274	0,0028
CAT-1-XRT	1,08	1,133	0,18	1,053	0,167	0,0024
CAT-1-XIT	0,74	0,600	0,19	0,810	0,291	0,0027
CAT-1(pRS42K::XI)	1,94	1,067	0,30	0,550	0,331	0,0041
CAT-1-XRT (pRS42K::XI)	1,71	0,733	0,24	0,428	0,144	0,0034
CAT-1-XIT (pRS42K::XI)	2,17	0,767	0,63	0,354	0,292	0,0088
CAT-1- (pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evo	2,44	1,967	0,26	0,806	0,158	0,0036
CAT-1-XRT (pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evo	1,35	0,800	0,32	0,593	0,242	0,0044
CAT-1-XIT (pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evo	16,70	3,500	6,78	0,210	0,404	0,0941

**Tabla 5 Evaluación de consumo de xilosa y producción de etanol a las 72 horas de crecimiento de las nueve cepas de estudio en medio MM.**

Cepas	Xilosa consumida (g/L)	Biomasa(g /L)	Etanol (g/L)	Y <sub>Biomasa/xilosa</sub> (g/g)	Y <sub>Etanol/xilosa</sub> (g/g)	Productividad (g/(L.h))
CAT-1-	0,77	0,833	0,28	1,087	1,149	0,00385
CAT-1-XRT	3,29	0,600	0,38	0,183	0,190	0,00533
CAT-1-XIT	2,32	0,700	0,43	0,302	0,287	0,00598
CAT-1 (pRS42K::XI)	1,28	0,567	0,61	0,443	1,555	0,00842
CAT-1-XRT (pRS42K::XI)	1,01	0,800	0,51	0,789	0,522	0,00713
CAT-1-XIT (pRS42K::XI)	1,72	0,600	0,81	0,349	0,472	0,01126
CAT-1 (pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evo	1,75	1,300	0,76	0,745	0,859	0,01056
CAT-1-XRT (pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evo	0,76	0,633	0,58	0,828	0,753	0,00799
CAT-1-XIT (pRS42K::XI) 10 <sup>ma</sup> evo	5,98	1,967	2,61	0,329	0,451	0,03628

**12.1.2 Evaluación del pool CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10<sup>ma</sup> evolución crecido durante 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de xilosa.**

**Tabla 6 Evaluación de la fermentación del pool CAT-1-XIT(pRS42K::XI) a las 72 horas.**

Xilosa Inicial (g/L)	Xilosa Final (g/L)	Xilosa Consumida (g/L)	Etanol (g/L)	Biomasa (g/L)	Y <sub>Biomasa/xilosa</sub> (g/g)	Y <sub>Etanol/xilosa</sub> (g/g)	Productividad (g/(L.h))
32.4	1.2	31.2	10.4	2.5	0.08	0.33	0.0046
38.6	6.3	32.3	10.1	3.2	0.10	0.31	0.0044
41.3	6.4	34.9	11.0	3.6	0.10	0.31	0.0044
61.5	19.2	42.3	12.7	3.5	0.08	0.30	0.0042
68.4	23.6	44.9	13.4	3.2	0.07	0.30	0.0041
80.4	42.9	37.5	9.3	3.1	0.08	0.25	0.0034

**12.1.3 Perfil de crecimiento, consumo de xilosa y producción de etanol deCAT-1-XIT (pRS42K::XI)(10<sup>ma</sup> evolución).**

**Tabla 7 Evaluación de la fermentación del pool CAT-1-XIT(pRS42K::XI) a las 132 horas.**

Tiempo	Xilosa final (g/L)	Biomasa (g/L)	Etanol (g/L)
0	55.5	0.24	0.50
12	43.1	0.27	0.21
24	39.9	0.42	0.02
36	39.3	0.33	0.15
48	39.4	0.82	0.72
60	36.9	0.29	1.36
72	31.4	1.56	2.77
84	25.6	1.27	6.09
96	23.5	6.09	7.22
108	20.9	0.62	10.08
120	16.9	3.27	11.36
132	14.5	4.03	12.57