



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUIMICO BIOLOGICAS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
TESIS

“Selección y manipulación genética de una levadura
tolerante y sobreproductora de etanol”

PRESENTA:

I.B.Q. JOSE ARNOLDO LOPEZ ALVAREZ

ASESOR:

D. C. Jesús Campos García

MORELIA, MICHOACÁN., AGOSTO 2007

INDICE

I. INTRODUCCION	2
1. Generalidades	2
1.1 Fermentación	2
2. Los Alcoholes	3
2.1 El etanol	4
3. Proceso de obtención de etanol por fermentación de azúcares	5
3.1 Producción de etanol por fermentación de azúcares	5
3.2 Sustratos utilizados en la producción de etanol	6
3.3 Organismos fermentadores	7
4. Fermentación con levaduras	8
4.1 Levaduras	8
4.2 Distribución de las levaduras	9
4.3 Utilización de levaduras seleccionadas para la fermentación	9
4.4 Poder fermentativo de las levaduras	11
5. La biotecnología en la producción de etanol	12
5.1 Uso de microorganismos manipulados genéticamente en la obtención de etanol	12
5.2 Aspectos considerados en el mejoramiento de organismos productores de etanol	13
5.3 Incremento de la tolerancia a diversas condiciones del proceso de fermentación	14
6. Efectos tóxicos del etanol sobre los organismos	14
6.1 Tolerancia al etanol	16
6.2 Proteínas de respuesta a condiciones de estrés y la tolerancia a etanol	19
6.3 Chaperonas moleculares	21
6.4 Familia Hsp70	22
6.5 Homólogos de SSQ1	23
7. Caracterización del sistema HscA/HscB	24

7.1. Caracterización del sistema HscA/HscB en <i>P. aeruginosa</i>	24
7.2. Caracterización del sistema HscA/HscB en <i>S. cerevisiae</i>	25
8. Genes involucrados en el ensamblaje de grupos Fe-S	25
II ANTECEDENTES EXPERIMENTALES	27
III JUSTIFICACION	28
IV. HIPOTESIS	29
V. OBJETIVOS	29
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	30
A) Cepas, medios y plásmidos	30
B) Medios de cultivo	32
C) Métodos	34
1. Aislamiento de levaduras del jugo de Agave	34
2. Selección de levaduriformes	35
3. Parámetro de selección de los aislados	35
3.1 Crecimiento en medio YPD con diferentes concentraciones de glucosa	35
3.2 Análisis de osmotolerancia	35
3.3 Análisis de tolerancia a etanol	36
3.4 Determinación de la dosis letal 50 (DL 50)	36
3.5 Curva de viabilidad	37
3.6 Producción de etanol (Fermentación) con diferentes fuentes de nitrógeno	37
3.7 Determinación de parámetros durante la fermentación alcohólica	38
3.7.1 Cuantificación de azúcares y etanol	38
3.7.2 Determinación de la población celular en la fermentación	38
4 Manipulación y análisis de ácidos nucleicos	39
4.1 Extracción de DNA total de levaduras	39
4.2 Electroforesis en gel de agarosa	40
4.3 Amplificación de una región del gen que codifica al RNA ribosomal 26S	40
4.3.1 Limpieza de los productos de PCR	41
4.3.2 Secuenciación de los productos de PCR	41

4.3.3 Análisis tipo Blast	42
5. Selección de mutantes auxótrofos a uracilo	42
6. Transformación de la cepa auxótrofa a uracilo UMPe1ura- con los plásmidos pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1)	42
6.1 Aislamiento de plásmido por lisis alcalina	42
6.2 Preparación de células electrocompetentes de levadura UMPe1ura-	43
6.3 Electroporación de las células electrocompetentes de la levadura UMPe1ura-	44
6.4 Selección de levaduras transformantes UMPe1ura-pYES2(SSQ1) y UMPe1ura-pYES3(JAC1)	45
VII. RESULTADOS	46
1. Aislamiento de levadura del jugo de Agave	46
1.2 Selección de los aislados productores de etanol	47
2. Parámetros de selección de los aislados	47
2.1 Crecimiento en medio YPD con diferentes concentraciones de glucosa	47
2.2 Análisis de osmotolerancia	49
2.3 Tolerancia a etanol	51
2.4 Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la fermentación alcohólica de jugo de Agave	53
3. Identificación genética de los aislados	54
4. Efecto de la expresión de las chaperonas moleculares SSQ1 y JAC1	59
4.1 Selección de auxótrofos a uracilo	59
5. Transformación de la cepa auxótrofa a uracilo (UMPe1ura-) con los plásmidos pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1)	61
6. Análisis de los parámetros fermentativos de las cepas transformadas con los plásmidos pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1)	63
6.1 Crecimiento en medio YPD con diferentes concentraciones de glucosa	63
6.2 Tolerancia a etanol	64
6.3 Obtención de la dosis letal 50 (DL 50)	66

6.4 Viabilidad celular al 11% de etanol	68
7. Producción de etanol en la fermentación de jugo de Agave a 16 °Brix adicionado con sulfato de amonio	69
VIII. DISCUSIÓN	72
IX. RESUMEN DE RESULTADOS	80
X. CONCLUSIONES	81
XI. BIBLIOGRAFIA	82

RESUMEN

El etanol es obtenido principalmente por la fermentación alcohólica mediante el uso de microorganismos fermentadores como son las levaduras, las cuales consumen los azúcares presentes en el medio convirtiéndolos en etanol. Sin embargo, el etanol llega a ser tóxico a ciertas concentraciones para el microorganismo que lo produce, afectando la producción de este metabolito. Para esto los organismos poseen sistemas de protección contra este metabolito, entre los cuales se encuentran las proteínas denominadas chaperonas moleculares, las cuales se han encontrado ampliamente distribuidas en los organismos. Tal es el caso de la chaperona molecular HscA en la bacteria no fermentadora *P. aeruginosa*, ésta chaperona se ha sugerido estar involucrada en el mecanismo de tolerancia a etanol. Por tal motivo el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la expresión de la chaperona molecular homologa SSQ1 y la co-chaperona molecular JAC1 en levaduras auxótrofas a uracilo obtenidas a partir de cepas silvestres aisladas de jugo de Agave seleccionadas por tolerancia y producción de etanol. Los resultados de los ensayos realizados en este trabajo indican que la cepa transformada con el plásmido pYES2(SSQ1) presentó una mayor tolerancia a etanol, siendo un 10% más que la cepa silvestre y un 12% más tolerante que la cepa auxótrofa a uracilo o parental. El incremento en la producción de etanol obtenido fue un 10% mayor en la cepa transformada con el plásmido pYES2(SSQ1), comparado con la cepa silvestre y un 20% más que su parental, mientras que la transformación con el plásmido pYES3(JAC1), mostró niveles de tolerancia y producción de etanol similares a los mostrados por la cepa silvestre. Lo anterior nos llevó a concluir que la transformación de la levadura con el plásmido que expresa la chaperona molecular SSQ1 aumenta el nivel de tolerancia al etanol lo que a la postre genera una mayor de producción de etanol. Los datos sugieren que la Chaperona SSQ1 en la cepa de *Kluyveromyces marxianus* está involucrada en la tolerancia y producción de etanol.

I. INTRODUCCION

1. GENERALIDADES

1.1 FERMENTACION.

La fermentación es un proceso metabólico de los organismos vivos que se lleva a cabo en ausencia de oxígeno. Bioquímicamente se puede definir a la fermentación alcohólica como un conjunto de reacciones catabólicas que conducen a la generación de ATP y NADH, donde los compuestos orgánicos (etanol, ácido acético, ácido láctico, etc) sirven tanto de donadores primarios como de aceptores finales de electrones; y la producción del ATP es mediante fosforilación a nivel de sustrato, en la cual adicionalmente existe la acumulación de diversos compuestos orgánicos llamados productos de fermentación.

En los seres vivos, la fermentación es un proceso anaeróbico en el cual no interviene la cadena respiratoria. Son propias de los microorganismos, como bacterias y levaduras. También se produce la fermentación en el tejido muscular de los animales, cuando el aporte de oxígeno a las células no es suficiente para el metabolismo y la contracción muscular.

La fermentación alcohólica que comienza con el catabolismo de la glucosa, se le denomina vía de Embden-Meyerhof la cual puede ser dividida en dos partes (Figura 1). La primera es una serie de reacciones preparatorias que no implican oxido-reducción y que conducen a la producción del intermediario clave, el gliceraldehído-3-fosfato. En la segunda parte tienen lugar reacciones de oxido-reducción, se produce energía en forma de ATP y son liberados los productos de fermentación, por ejemplo; en la fermentación alcohólica se produce etanol y CO₂. Es sin duda la fermentación la etapa clave en el proceso de la elaboración de bebidas alcohólicas. La característica principal de este proceso es que existe la intervención de seres vivos, como bacterias y levaduras, siendo estas últimas las más utilizadas. Estos microorganismos se encargan de convertir los azúcares

presentes en el mosto en una serie de compuestos, siendo el principal metabolito en el caso de la fermentación alcohólica el etanol.

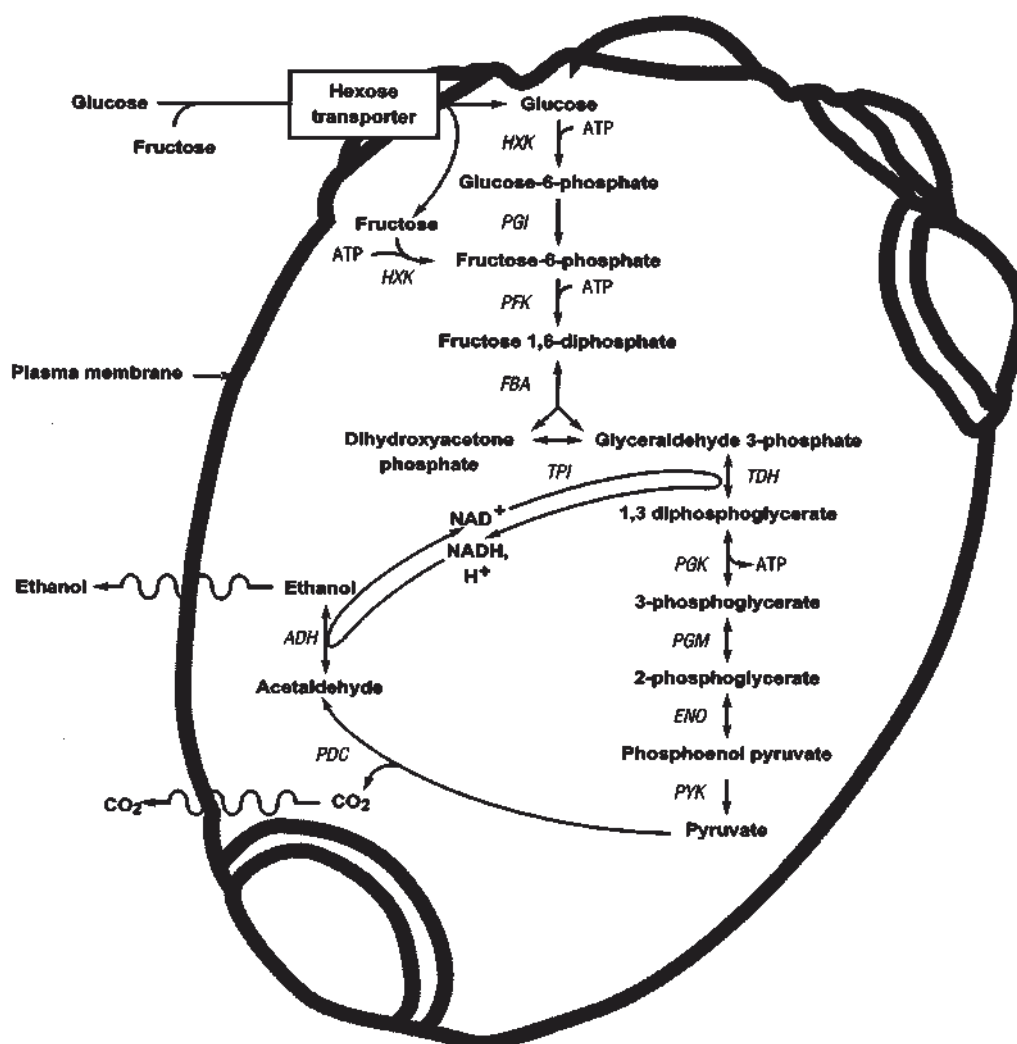


FIGURA 1: Formación de etanol y dióxido de carbono a partir de glucosa por la vía glucolítica de EMBDEN-MEYERHOF por la levadura *S. cerevisiae* (Tomado de Jacques y col., 2003).

2. LOS ALCOHOLES.

El nombre de alcohol proviene del árabe *al-kukhūl*, que significa espíritu, ya que antiguamente se le conocía a las bebidas alcohólicas como espíritus y es el nombre con el cual los alquimistas de la Europa medieval nombraban a las

esencias obtenidas por destilación, estableciendo así su significado actual (Encarta 2006). En química se denomina alcohol a aquellos hidrocarburos o alcanos que contienen un grupo hidroxilo (-OH) en sustitución de un átomo de hidrógeno enlazado de forma covalente.

Los alcoholes se pueden clasificar en primarios, secundarios y terciarios, dependiendo de la cantidad de carbonos que están unidos directamente al carbono unido al grupo -OH, el cual es la parte mas reactiva de la molécula y proporciona sus propiedades químicas, por lo tanto de los alcoholes se pueden sintetizar un gran número de compuestos alifáticos como son: halogenuros de alquilo, alquenos, éteres, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, entre otros (Chang, 1996).

Las propiedades físicas de un alcohol se comprenden mejor recordando que estructuralmente esta compuesto de un alcano y agua, el cual contiene una región hidrofóbica similar a un alcano y una región hidrofílica perteneciente al grupo hidroxilo muy similar al agua. De estas dos unidades estructurales, el grupo -OH da a los alcoholes sus propiedades físicas y químicas características y el alquilo es el que las modifica, dependiendo de su tamaño y forma (Morrison y Boyd, 1996). Dentro de la amplia variedad de alcoholes encontramos al etanol o alcohol etílico, el cual es producido principalmente de manera biológica por la fermentación de azúcares, siendo el componente principal de las bebidas alcohólicas y usado como biocombustible actualmente. Todas las bebidas alcohólicas, el etanol usado como combustible y más de la mitad del etanol industrial son todavía obtenidos por este proceso.

2.1 El etanol

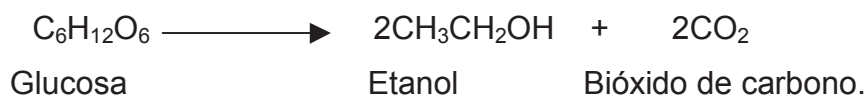
El alcohol etílico o etanol, se clasifica como un alcohol primario monohídrico. Es un líquido incoloro, transparente, volátil, inflamable y con cierto grado de toxicidad, de sabor quemante y olor agradable característico, es soluble

en agua, tiene un punto de fusión de $-115\text{ }^{\circ}\text{C}$, un punto de ebullición de $78.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una densidad relativa de 0.789 g/l a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Morrison y Boyd, 1996). Además, el etanol se utiliza como solvente y su principal uso es como intermediario en la síntesis de innumerables compuestos orgánicos. La deshidratación del etanol produce dietil eter, el cual es empleado como solvente y anestésico. La deshidrogenación del etanol produce acetaldehído, que es la materia inicial para la síntesis de varios compuestos orgánicos entre los que encontramos el ácido acético, anhídrido acético, cloral, butanol y etilhexanol. Las reacciones con ácidos carboxílicos producen ésteres, los cuales tienen varias aplicaciones. El grupo hidroxilo del etanol puede ser remplazado por un halogenuro para dar haluros de etilo. El tratamiento del etanol con ácido sulfúrico produce sulfato de etilo hidrogenado y dietil sulfato. Estos y otros químicos derivados del etanol son utilizados en medicina, en la elaboración de colorantes, hules, solventes, detergentes, adhesivos, cosméticos, explosivos, pesticidas, resinas sintéticas, etc. (Roehr, 2001).

3. PROCESO DE OBTENCIÓN DE ETANOL POR FERMENTACIÓN DE AZUCARES

3.1 Producción de etanol por fermentación de azúcares.

El etanol es obtenido principalmente por un proceso de fermentación de azúcares y es conocido como “bioetanol”. El líquido fermentado, llega a contener en promedio de un 7 a un 12% de etanol (v/v), dependiendo de la concentración de azúcares fermentables disponibles, el cual se puede concentrar y llegar hasta un 95% mediante una serie de destilaciones. (Jacques y col., 2003). La reacción que representa este proceso fermentativo es la siguiente:



3.2. Sustratos utilizados en la producción de etanol

El etanol puede ser obtenido a partir de diferentes tipos de materias primas las cuales son agrupadas de acuerdo al tipo de carbohidratos que contienen:

a) Materias primas azucaradas: éstas generalmente contienen una mezcla de sacarosa, glucosa y fructosa; como ejemplo están el jugo de caña, las mieles, las melazas y frutas (Glazer y Hirochi, 1993). El jugo de Agave para fermentación es extraído durante la molienda de la piña previamente cocida. El jugo es obtenido de *Agave tequiliana* weber variedad azul; contiene un 60% de agua, 24% de inulina, 11% en fibras, 1.5% en azúcares reductores, 0.02% de proteína y 2.7% en cenizas, el principal azúcar presente en el mosto de agave es la fructosa y en menor porcentaje la glucosa, en una relación de 4:1 (Sánchez y col., 1953).

b) Materias primas ricas en almidón: Como ejemplo están los almidones procedentes de la yuca, la papa, maíz y otros cereales. Estas consisten de una fracción soluble en agua llamada amilosa (20%) y una fracción de alto peso molecular llamada amilopectina (80%). Este tipo de materias primas deben recibir un tratamiento previo para convertir los polímeros de almidón en monosacáridos de glucosa (Glazer y Hirochi, 1993).

c) Materias primas celulósicas: la celulosa es obtenida de la lignocelulosa procedente de fibras maderables. La longitud de la macromolécula varía de acuerdo a su fuente y al grado de procesamiento que ha sufrido. Para aprovechar este carbohidrato en la generación de etanol, es necesaria la hidrólisis de este polímero, donde se libera una mezcla de azúcares que incluyen primordialmente glucosa, xilosa, manosa, galactosa y arabinosa (Kosaric y col., 2001).

3.3 Organismos fermentadores

El microorganismo a utilizar es una parte central para el proceso de fermentación ya que la elección del microorganismo adecuado no sólo se limita a que pueda efectuar la reacción deseada, sino también a que pueda efectuar el cambio bioquímico necesario en un menor tiempo y a su vez que produzca el rendimiento máximo posible (Rodríguez y col., 1999).

La conversión de glucosa a alcohol es realizada principalmente por levaduras, pero en el caso de bacterias se ha observado que sólo algunas son capaces de llevar a cabo este proceso (Tabla 1).

Tabla 1. Microorganismos productoras de etanol y los carbohidratos utilizados como sustratos (Modificado de Reséndiz, 2007)

MICROORGANISMO	SUSTRATOS
LEVADURAS	
<i>Saccharomyces sp.</i>	
<i>S. cerevisiae</i>	Glucosa, fructosa y sacarosa
<i>S. carlsbergensis</i>	Glucosa, fructosa, galactosa, maltosa maltotriosa y xilulosa.
<i>S. rouxii</i> (osmofílico)	Glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa.
<i>Kluyveromyces sp.</i>	
<i>K. marxianus</i>	Glucosa, fructosa y sacarosa
<i>K. fragilis</i>	Glucosa, galactosa y lactosa.
<i>K. lactis</i>	Glucosa, galactosa y lactosa.
<i>Candida sp.</i>	
<i>C. pseudotropicalis</i>	Glucosa, galactosa y lactosa.
<i>C. tropicales</i>	Glucosa, xilosa y xilulosa.
BACTERIAS	
<i>Zymomonas mobilis</i>	Glucosa, fructosa y sacarosa.
<i>Clostridium. thermocellum</i>	Glucosa, celobiosa y celulosa
<i>Clostridium. thermohydrosulfuricum</i>	Glucosa, xilosa, sacarosa, celobiosa y almidón.
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	Glucosa, sacarosa y celobiosa.
<i>Thermobacteroides acetoethylicus</i>	Glucosa, sacarosa y celobiosa.

En fermentaciones industriales se usan principalmente las levaduras del género *Saccharomyces*, ya que estas presentan las características de un productor de etanol ideal. Dentro de las especificaciones que tendrían los organismos fermentadores se incluyen las siguientes características:

- a) Capacidad para fermentar un amplio rango de sustratos a altas velocidades.
- b) Tolerancia a etanol y la capacidad para producir altas concentraciones de etanol.
- c) Bajos niveles de formación de subproductos, tales como ácidos grasos y glicerol.
- d) Osmotolerancia (capacidad para resistir la presión osmótica provocada por las altas concentraciones de azúcares).

Aunque en la actualidad todavía tienen limitaciones importantes como un estrecho rango de sustratos metabolisables y una tolerancia limitada al alcohol (Glazer y Hirochi, 1993).

4 FERMENTACION CON LEVADURAS

4.1 Levaduras.

El grupo de microorganismos conocido como levaduras se clasifican dentro del reino fungi (hongos) predominando la forma unicelular. Una levadura se define como un hongo basidiomiceto que se multiplica de manera vegetativa, principalmente por gemación o fisión y que no presenta durante su fase sexual cuerpos fructíferos internos y externos (Kurtzman y fell., 1998).

En 1999 Pretorius y col., encontraron 15 géneros de levaduras durante la etapa de fermentación en la elaboración del vino y en el caso de fermentación natural de jugo de Agave se han identificado 10 géneros de levaduras que participan en la fermentación de éste entre las cuales podemos mencionar: *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Iwatcheskia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* (Lachance, 1995).

4.2 Distribución de las levaduras.

Las levaduras han colonizado gran parte del planeta ya que se pueden aislar del aire, del agua y de la tierra; esto depende de la presencia de la fuente de carbono, principalmente azúcares reductores. Ya que no poseen la capacidad de desplazarse por si mismas dependen de vectores como el viento, insectos, animales o la misma actividad humana (Vaughan Martín y Martín, 1995). Las levaduras cuentan con la capacidad de desarrollarse bajo la presencia o no de oxígeno, lo que representa una ventaja importante para la industria de la fermentación ya que las condiciones iniciales del cultivo tienen una amplia repercusión sobre los rendimientos de producción de biomasa o de producción de etanol.

En condiciones aeróbicas con niveles bajos de azúcar, las levaduras entran en fase de crecimiento y no de fermentación llevando a cabo el efecto Pasteur. En condiciones con niveles altos de azúcar rápidamente son metabolizados reprimiendo la habilidad de la célula para realizar la respiración, aunque no haya deficiencia de oxígeno convirtiendo inmediatamente los azúcares en etanol. Este efecto es conocido como respiración catabólica (Barnett, 1981).

Estos procesos metabólicos y regulatorios tienen aplicaciones importantes en el diseño de procesos de fermentación alcohólica o en la producción de biomasa de levadura. Así se demuestra la importancia de elegir las condiciones adecuadas para desarrollar las levaduras (preparación de un inóculo) o fermentar el mosto.

4.3 Utilización de levaduras seleccionadas para la fermentación.

Inicialmente todas las fermentaciones se realizaban de manera espontánea con cepas de levadura nativas sobre las que no había ningún control. El pionero en el uso de cultivos puros fue el Danes Hansen en el proceso de elaboración de

cerveza; en 1890 Müller-Thurgua introdujo el concepto de la inoculación de las fermentaciones de jugo de uva a partir de cultivos puros de levaduras. En 1965 se produjeron las dos primeras levaduras secas activas para su uso en la fabricación de vinos en California. Sin embargo hasta 1980 en Europa los productores de vinos seguían trabajando con fermentaciones espontáneas (Pretorius, 2000). Actualmente los productores de vinos se dividen en tres grupos, los que siguen usando el proceso antiguo con fermentaciones espontáneas, el otro grupo que prefiere el uso de levaduras secas activas para inocular la fermentación y un tercero que prefiere la fermentación espontánea más la adición de levaduras como coadyuvante.

En la actualidad diferentes empresas poseen una amplia gama de levaduras, particularmente *Saccharomyces cerevisiae* con características específicas para cada uno de sus procesos. Las levaduras secas que hoy se comercializan y aquellas que se aíslan para llevar acabo fermentaciones deben presentar una serie de características deseables que permitan obtener propiedades específicas, tanto en el proceso como en el producto elaborado (Pretorius, 2000).

- a) Propiedades fermentativas: Inicio rápido de la fermentación, alta eficiencia de fermentación, elevada tolerancia al etanol, alta osmotolerancia y producción moderada de biomasa.
- b) Propiedades aromáticas: Formación limitada de compuestos azufrados y de alcoholes superiores, así como ácidos orgánicos.
- c) Propiedades tecnológicas: Alta estabilidad genética, alta tolerancia al sulfito, baja formación de espuma, formación de sedimentos compactos y una baja demanda de nitrógeno.

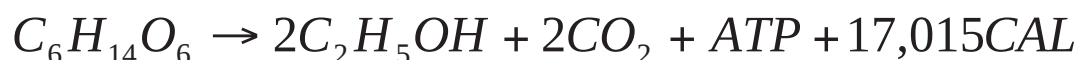
Varias de estas propiedades, tanto del proceso como del producto, son deseables en la elaboración del tequila. Cabe mencionar que las levaduras que se comercializan actualmente son levaduras de panificación y en algunos casos

vitivinícolas que son adaptan a este mosto (jugo de Agave) y pocas o ninguna cumple con las propiedades descritas anteriormente.

4.4 Poder fermentativo de las levaduras.

El poder fermentativo también llamado poder alcoholígeno, se define como el máximo porcentaje de etanol que una cepa de levadura es capaz de producir al fermentar un mosto con un exceso de azúcares (Glazer y Hirochi, 1993). El poder alcoholígeno presenta una amplia variabilidad entre distintas especies de levaduras vitivinícolas y a menudo entre distintas cepas que pertenecen al mismo género. Esta variabilidad en la producción de etanol entre especies es debida a la capacidad de tolerar el etanol producido. Otros factores que influyen en el poder fermentativo son la concentración de azúcar en el mosto, la temperatura, el pH del medio, las sales presentes en el medio de fermentación, y la fuente de nitrógeno asimilable por el microorganismo. Estos últimos factores influyen de manera muy variable en las diferentes cepas involucradas en la fermentación.

En condiciones anaeróbicas las levaduras convierten los azúcares en alcohol por la vía Embden-Meyerhof (Figura 1). La reacción neta global involucra la producción de 2 moles de etanol, 2 moles de dióxido de carbono y ATP por cada mol de glucosa fermentada; en peso, significa que cada gramo de glucosa produce teóricamente 0.51 gramos de etanol, de acuerdo con la siguiente ecuación global:



$$\text{Rendimiento} = \frac{92.14}{180.16} = 0.51$$

El rendimiento obtenido en la práctica, generalmente se encuentra entre el 90 y 95% del teórico; esto se debe al requerimiento del 4 a 5% de sustrato para el mantenimiento y producción de biomasa (Glazer y Hiroshi, 1993).

5. LA BIOTECNOLOGIA EN LA PRODUCCION DE ETANOL.

Una de las técnicas más utilizadas en la biotecnología actual es el uso del ADN recombinante, permitiendo que genes procedentes de otros organismos sean expresados o manipulados con el fin de modificar o construir organismos que adquieren nuevas ventajas como un aumento en el nivel de la actividad enzimática, permitiendo obtener mayor cantidad de productos de interés comercial como son el etanol (Ingram y col., 1987; 1989). Así, la incorporación de modificaciones genéticas en los microorganismos ha ayudado a reducir los costos de producción de bienes (Ingram y col., 2003).

5.1 Uso de microorganismos manipulados genéticamente en la obtención de etanol.

El uso de Microorganismos Manipulados Genéticamente (MMG) para el proceso fermentativo se considera una buena alternativa para la obtención de combustibles permitiendo cubrir las demandas energéticas. Se pretende que con los MMG la producción de etanol sea más eficiente y que reduzca los costos de producción.

Usando técnicas de ADN recombinante se pueden obtener organismos más eficientes en la producción del etanol. Como ejemplo podemos mencionar la transferencia de algunos genes de la ruta de síntesis de etanol provenientes de *Zimomonas mobilis*, una bacteria productora de etanol, a una bacteria entérica, *Escherichia coli*, que tiene la capacidad de metabolizar tanto pentosas como hexosas, permitiendo obtener un organismo capaz de sintetizar etanol a partir de diferentes azúcares (Ingram y col., 1989; Ingram y col., 1998).

E. coli es uno de los microorganismos más ampliamente estudiados, por lo que es una de las bacterias más utilizada como vehículo para la clonación, manipulación y la modificación de genes, lo que lo hace el más importante huésped en la obtención de productos de origen recombinante; aunque en años recientes el número de huéspedes para el uso de ADN recombinante se ha ampliado al uso de una gran variedad de bacterias, levaduras, hongos, plantas y otras células eucariontes (Ingram y col., 1989). Aunque, *E. coli* sigue siendo el huésped preferido en la actualidad se comienza a utilizar a las levaduras principalmente a *S. cerevisiae* para la realización de ensayos con ADN recombinante ya que al igual que *E. coli* posee ventajas entre las que podemos mencionar que es uno de los microorganismos de los cuales actualmente se tiene mayor información acerca de su genética, biología molecular, bioquímica, fisiología y biología general. Entre otras ventajas están: la rápida velocidad de crecimiento, la facilidad con la que pueden ser aisladas poblaciones genéticamente distintas (Glick y Pasternak, 1998), es una levadura con capacidad nativa para metabolizar diferentes azúcares y es un microorganismo versátil que puede crecer en condiciones aerobias o anaerobias, además de ser una célula eucarionte (Kosaric y col. 2001).

5.2 Aspectos considerados en el mejoramiento de organismos productores de etanol

Entre los aspectos considerados en el mejoramiento de organismos productores de etanol que harían el proceso más rentable económicamente se encuentran:

- a) Expresión de genes involucrados en la biosíntesis del etanol procedente de organismos con altas capacidades fermentativas.

- b) Aumentar el rango de sustratos metabolizables mediante la introducción de genes externos involucrados en su catabolismo.
- c) Aumento en la tolerancia a las distintas condiciones del proceso, como la tolerancia a altas concentraciones de etanol, a altas concentraciones de azúcares, tolerancia a variaciones en pH, salinidad y temperatura.
- d) Estabilidad genética de las cepas fermentadoras mejoradas (estabilidad de plásmidos y/o modificaciones genéticas).
- e) Escalamiento industrial.

5.5. Incremento de la tolerancia a diversas condiciones del proceso de fermentación

El conocimiento de nuevos mecanismos que permitan producir organismos mas tolerantes al etanol, es uno de los aspectos a considerar cuando se trabaja con microorganismos fermentadores, resultando en una mayor optimización del proceso fermentativo (Martínez y col., 2000). Ya que al ser el alcohol tóxico para ellos y sólo pequeñas concentraciones de este son acumuladas durante la fermentación alcohólica. Se ha inferido que la producción del etanol esta limitada por el efecto inhibitorio que ejerce el propio etanol sobre la cepa que lo produce. (Osman e Ingram, 1985; Walker, 1998).

6. EFECTOS TOXICOS DEL ETANOL SOBRE LOS ORGANISMOS

En la actualidad se sabe que el etanol produce efectos inhibitorios sobre los microorganismos, los cuales van desde efectos imperceptibles hasta un efecto letal generalizado.

En estudios anteriores en la cepa *E. coli* E102 se ha observado que el etanol produce la disminución del crecimiento, la inhibición de la división celular y

la muerte de células en presencia de éste; la adición del etanol en la fase exponencial de un cultivo de esta bacteria, causó una disminución inmediata en el crecimiento, pero este efecto fue revertido al eliminar el etanol del medio de cultivo (Fried y col., 1973). En microorganismos fermentadores, existen hipótesis en las cuales se menciona que el mecanismo de inhibición de la fermentación se debe a la inhibición por retroalimentación o por la inactivación de enzimas involucradas en la producción del etanol (Yehia y col., 1985). Así mismo se sabe que el etanol puede intercalarse en la membrana, alterando la organización en la interfase acuosa-fosfolípidos de la membrana, además también puede intercalarse entre las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos o de los componentes de las proteínas o en ambas (Fried y col., 1973), lo que causa que la barrera se debilite en lo que respecta al intercambio de moléculas polares. Como efecto final hay una pérdida de la integridad de la membrana plasmática afectando la capacidad de las células para mantener un gradiente de concentración y afectando además los sistemas involucrados en el transporte de solutos (Rodríguez, 1992).

Como el etanol actúa como un ácido débil, este se convierte en un donador de protones ya que al encontrarse el etanol en solución acuosa induce la formación de agua protonada y de un radical libre (Figura 2). Así mismo el metabolismo del etanol induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH^\cdot$), provocando estrés oxidativo en el microorganismo (Rodríguez, 1992).

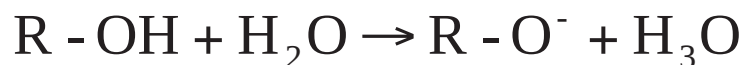


Figura 2. Formación de radicales libres del etanol en solución acuosa.

Por otro lado el efecto tóxico que causa el etanol en los microorganismos a nivel protéico, podemos mencionar que este causa la desnaturalización de proteínas ya que cada tipo de proteína tiende a formar estructuras estables con la

formación de enlaces entre cadenas y que en presencia del etanol, este tiene la capacidad de romper las interacciones no covalentes entre cadenas evitando que la proteína logre su conformación terciaria lo que a su vez ocasiona que se convierta en una proteína inactiva, la cual es marcada y destruida. (Alberts, 2002).

6.1. Tolerancia al etanol

Todo organismo vivo tiene la capacidad de adaptarse a diversas condiciones del ambiente, los microorganismos no son la excepción, pues han desarrollado por selección natural diversas estrategias, tanto para metabolizar diferentes nutrientes como para resistir a los diversos factores que pueden causarles daños, asegurando de esta manera su viabilidad.

La extrema toxicidad que ejercen los solventes orgánicos en los microorganismos causa un serio problema, tal es el caso del etanol, que tras su acumulación en el medio de fermentación, causa efectos adversos en el crecimiento del microorganismos y en su propia biosíntesis (Ingram, 1980).

Entre los mecanismos de tolerancia a solventes orgánicos en levaduras y bacterias se encuentran:

a) Cambios en la membrana plasmática. La membrana plasmática posee una estructura lipídica, la cual es responsable de muchas funciones, entre estas destacan el transporte y la producción de energía, además la membrana contiene proteínas de transporte que permiten la captación de metabolitos y la liberación de otras sustancias, así como bombas de iones que permite mantener un potencial de membrana (Murray, 2002). Aunque la bicapa de lípidos de la membrana citoplásmica es una barrera eficiente para discriminar la entrada de moléculas hidrofílicas, permite que pequeñas moléculas anfifílicas tales como el etanol pasen libremente sin necesidad de una permeasa específica.

Han sido observados varios mecanismos de respuesta a nivel de membrana para contrarrestar los efectos tóxicos debidos a la acumulación de solventes orgánicos. Estos cambios incluyen: la modificación del grado de saturación de lípidos de la membrana, cambios en la composición de lípidos, el recambio y la isomerización *cis-trans* de los lípidos insaturados. Esta isomerización de los lípidos de la membrana juega un papel muy importante en la tolerancia a solventes orgánicos, permitiéndole a la célula sobrevivir al daño inicial; sin embargo, se ha observado que la isomerización *cis-trans* de ácidos grasos no es el único mecanismo de tolerancia a los solventes (Yura y col., 2000). Los ácidos grasos no saturados de las levaduras son principalmente el ácido palmitoléico y el ácido oléico a los cuales se les ha atribuido un efecto protector en contra de los efectos tóxicos del etanol, el ácido oléico es incorporado en la bicapa de fosfolípidos produciendo una disminución de la fluidez de la membrana, lo cual impide que el etanol ingrese a la célula (Kyung y col., 2003). Esta relación entre la composición de lípidos y la tolerancia al etanol también fue observada cuando se encontró la presencia del ergosterol, fosfatidilcolina y ácidos grasos de cadena larga lo que ocasionó en el microorganismo una mayor tolerancia al etanol (Chi y Arneborg; 1999).

b) Producción de compuestos osmoprotectores. Entre estos se encuentran las biopelículas, las cuales son formadas por la agregación de microorganismos en estructuras multicelulares que se adhieren a las superficies. *Saccharomyces cerevisiae* puede formar biopelículas cuando se encuentra bajo condiciones de estrés como son la falta de nutrientes, condiciones extremas ambientales como un aumento o disminución en la temperatura así como a concentraciones altas de compuestos orgánicos como el etanol (Todd y col., 2001). Estas levaduras son capaces de formar biopelículas y como tales muestran características fisiológicas particulares derivadas probablemente de una expresión diferencial de genes (Gutierrez-Correa, 2003). Además del aspecto estructural, las biopelículas son importantes por que promueven un cambio fisiológico en los microorganismos. En levaduras, después de la adhesión se inicia una adaptación en respuesta a esta

nueva condición de crecimiento, la cual se refleja en la síntesis de polisacáridos y lipopolisacáridos, permitiéndole al microorganismo desarrollar una resistencia a varios compuestos orgánicos como el etanol. Aparentemente, los lipopolisacáridos y polisacáridos interactúan físicamente con el etanol uniéndolo y evitando que ingrese al interior de la célula, con lo que se genera la resistencia al etanol por parte de la biopelícula (Chandra y col., 2000).

c) Expulsión activa de solventes orgánicos. Varias cepas de levaduras como *Saccharomyces* cuentan con transportadores multidroga, siendo los antiportadores los más abundantes, a los cuales se les ha relacionado con la expulsión de algunos metaloides como arsénico y el antimonio o solventes orgánicos como el ácido octanóico, evitando la toxicidad que genera para el microorganismo. Uno de estos antiportadores está localizado en la membrana plasmática y se le ha visto asociado con la expulsión del etanol cuando este se encuentra a altas concentraciones, aunque hasta la fecha no se conoce el mecanismo de acción, (Cabral y col., 2002). Cabe mencionar que hasta el momento no se ha descrito un transportador que sea específico para la expulsión de etanol en levaduras.

d) Sistemas de respuesta a estrés oxidativo: El etanol causa dentro de la célula estrés oxidativo ya que al encontrarse en solución acuosa, se disocia formando especies reactivas de oxígeno. Uno de los mecanismos de defensa que presentan las levaduras es la acción de catalasas y peroxidasas, donde el etanol es oxidado a acetaldehído lo que llega a ocasionar un aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno. A su vez, las peroxidasas utilizan el peróxido de hidrógeno generado convirtiéndolo en agua con lo cual ayudan a destoxificar a la célula (Alberts y col., 2002).

e) Proteínas de respuesta a condiciones de estrés. La exposición de la célula al etanol es una causante de estrés, lo cual puede desencadenar en la síntesis de proteínas de respuesta a estrés, entre las cuales podemos mencionar a las

chaperonas moleculares, las cuales participan en la protección de algunas enzimas que son desnaturalizadas por el efecto tóxico del etanol, permitiendo que éstas no sufran la pérdida de su función o desnaturalización, por lo que la protección otorgada por este tipo de proteínas de respuesta a estrés permite la sobrevivencia del microorganismo.

6.2. Proteínas de respuesta a condiciones de estrés y la tolerancia a etanol

Las concentraciones altas de etanol y el aumento o disminución en la temperatura ambiental, son formas de estrés para los microorganismos, circunstancia que induce la síntesis de una gran variedad de proteínas (Farewell y col., 1998). Algunos estudios sugieren la participación de proteínas de repuesta a estrés en bacterias como un mecanismo de tolerancia a etanol (Smeds y col., 1998).

En eucariontes se ha observado la participación de algunas de las enzimas glicolíticas como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, enolasa y la fosfoglicerato cinasa como proteínas que responden a condiciones de estrés. En *Z. mobilis*, la exposición a altas concentraciones de etanol representa una forma de estrés natural (Barbosa y col., 1994). En este microorganismo se encontró la participación de algunas enzimas de la ruta glicolítica y fermentativa; las cuales incrementan en cantidad en respuesta a algún tipo de estrés aunque su papel fisiológico con respecto al estrés es desconocido. También, en *Z. mobilis* se encontraron tres proteínas que responden a estrés por calor y por etanol (SP70, SPS58 y SP18) las cuales corresponden a las proteínas homólogas DnaK, GroEL y GroES identificadas en *E. coli* (Haejung y col., 1991). Las proteínas de estrés GroES y GroEL son expresadas en *Z. mobilis* cuando este microorganismo es expuesto a concentraciones altas de etanol (alrededor del 10%), sin embargo, se ha observado en otros microorganismos que sus homólogos en otras bacterias no se acumulan en presencia de etanol (Barbosa y col., 1994).

En *E. coli* la proteína HtrA es inducible por estrés al calor y bajo condiciones que causan desnaturalización de proteínas en general. Esta proteína (HtrA) interviene en la renaturalización de proteínas (Smeds y col., 1998). En algunos eucariontes HtrA tiene un papel principal en la degradación de proteínas anormales y también se le ha involucrado en algunas funciones regulatorias como la apoptosis celular (Smeds y col., 1998, Birthe y col., 2004). En *Lactobacillus helveticus* se ha encontrado que HtrA se induce por estrés causado por etanol, piromicina y/o cloruro de sodio, aunque su papel preciso y la regulación de su expresión no se conoce con exactitud (Smeds y col., 1998).

Las propiedades físicas de la membrana parecen estar implicadas en la regulación de la expresión de proteínas que responden a estrés, como las proteínas de choque térmico o estrés al calor (Hsp, por sus siglas en inglés) y muchas chaperonas moleculares como GroEL, las cuales se asocian con la membrana en muchos microorganismos. Las Hsp asociadas a la membrana actúan de manera similar a su contraparte soluble evitando la desnaturalización de enzimas localizadas en la membrana (Vigh y col., 1998).

Las proteínas de estrés al calor se agrupan en familias, en donde cada familia contiene un subgrupo de proteínas que son clasificadas de acuerdo a su peso molecular. Cada subgrupo puede estar compuesto de proteínas que son sintetizadas en respuesta a un aumento en la temperatura, algunas que son sintetizadas constitutivamente pero cuya velocidad de síntesis aumenta por distintos factores como falta de nutrientes o compuestos tóxicos. Algunas proteínas de respuesta a calor son conocidas como “chaperonas moleculares” las cuales intervienen en diversos procesos de modificación protéica post-traducciona (LéJohn y col., 1994)

6.3 Chaperonas moleculares

El uso de chaperonas moleculares es uno de los mecanismos que poseen los organismos para tolerar el estrés ambiental. Chaperona molecular es el término que ha sido otorgado a varios miembros de familias de proteínas que comparten la capacidad de interactuar con otras proteínas con conformaciones no nativas a expensas de la hidrólisis de ATP (Frydman y Höhfeld, 1997). Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas entre los diferentes reinos, y su importancia radica en que éstas intervienen en los procesos moleculares como el plegamiento de proteínas nacientes, degradación y renaturalización de proteínas desnaturalizadas, transporte de proteínas, termotolerancia, ensamblaje de proteínas estructurales, integración de proteínas membranales, protección de proteínas sobre la acción de compuestos tóxicos, etc. (Herman y D'Ari, 1998). El ensamblaje y la degradación de proteínas parecen ser procesos contrarios, sin embargo, el hecho de que estos procesos sean llevados a cabo por la misma proteína revela lo sofisticado del control celular. La decisión de qué proceso llevar a cabo esta determinado por la afinidad de la proteína a la subunidad o al dominio de la chaperona (Suzuki y col, 1997). La estructura de las chaperonas moleculares consisten en dos anillos heptaméricos los cuales forman una estructura cilíndrica con dos cavidades, a los cuales se les une la co-chaperona formando una especie de tapa del cilindro formado por la chaperona molecular, dejando libre el extremo amino y el extremo carboxilo de la chaperona con los cuales reconocen y se une a la proteína que necesita ser asistida (Brinker, y Pfeifer, 2001).

Estas proteínas son sintetizadas en los organismos de manera constitutiva, sin embargo, se ha observado que su expresión se incrementa cuando un organismo esta expuesto a algún tipo de estrés ambiental como es calor, frío, sales, solventes, antibióticos, metales pesados, etc. (Blaszczak y col., 1995; Kedzierska y Matuszewska; 2001). En levaduras las familias Hsp70 y Hsp60 son las chaperonas moleculares más abundantes, dentro de las cuales cuentan con

diferentes miembros los cuales actúan en diferentes organelos (Alberts y col., 2002).

6.4 Familia Hsp70

Las proteínas conocidas como Hsp70 son una familia multigénica de proteínas ubicuas altamente conservadas, las cuales se han encontrado en todos los microorganismos (Gupta y col., 1993; Macario y col., 1999). Estas proteínas actúan como chaperonas moleculares dependientes de ATP. Originalmente descubiertas como proteínas inducidas por estrés al calor, es ahora conocido que muchos miembros de esta familia son expresados constitutivamente y participan en funciones celulares normales como la estabilización, plegamiento, procesamiento y transporte de proteínas (Parsell y col., 1991). En bacterias solamente han sido reportados dos miembros de esta familia siendo DnaK la más ampliamente estudiada a nivel molecular, mientras que en organismos eucariontes como levaduras se han encontrado múltiples miembros de la familia Hsp70 (Wild y col., 1992). En levaduras uno de los miembros de la familia Hsp70 es la proteína SSQ1, la cual es regulada por proteínas accesorias denominadas (co-chaperonas), para este caso JAC1 (Hsp40), las cuales estimulan la hidrólisis de ATP por la chaperona (Liberek y col., 1991). La función universal de las proteínas con dominio J estimulan la actividad de ATPasa de las chaperonas Hsp70s, una actividad que requiere un dominio muy conservado en JAC1 formado por prolina, histidina y ácido aspártico (HPD), el cual es requerido para la estabilidad y la interacción con las Hsp70s. JAC1 en *S. cerevisiae* posee 75 amino ácidos en el dominio J N-terminal y 83 aminoácidos en el domino C-terminal que sugiere está involucrado en la unión a otra proteína denominada Isu1 con la chaperona SSQ1; por lo que hay considerable evidencia que el dominio J dirige interacciones con la chaperona SSQ1 (Amy y col., 2006).

6.5 Homólogos de SSQ1

El homólogo de SSQ1 es codificado por el gen *hscA*, también conocido como Hsc66, con una masa molecular aproximada de 66 kDa la cual muestra aproximadamente 40% de identidad en su secuencia de aminoácidos respecto a SSQ1 y otras proteínas de la familia Hsp70 (Seaton y Vickery, 1994). El gen *hscA* está localizado cerca del minuto 54 en el cromosoma de *E. coli*, inmediatamente río arriba del gen *fdx* el cual codifica una ferredoxina [2Fe-2S] (Seaton y Vickery, 1994). Estos genes forman parte de un operón que incluye al gen *hscB* que codifica una proteína de 20 kDa con una región amino terminal que tiene similitud con el dominio J de las co-chaperonas. La similitud de la proteína Hsc20 con proteínas relacionadas con la familia Hsp40 sugiere que Hsc66 pueda usar esta proteína como su co-chaperona. Estos resultados sugieren que Hsc66/Hsc20 (también llamadas HscA/HscB) comprenden un sistema de chaperonas moleculares similar a los sistemas de la levadura *S. cerevisiae* SSQ1/JAC1 (Dutkiewicz y col., 2003). Gracias a los proyectos de secuenciación de genomas completos de diversos organismos se ha identificado la presencia del gen *hscA* en: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Azotobacter vinelandii*, *Buchnera aphidicola*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *S. typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Ralstonia solanacearum*, *Pasteurella multocida*, *Rickettsia conorii*, *R. prowazekii*, *Sacharomyces cerevisiae* entre muchos otros organismos.

El primer organismo en que se demostró que las proteínas Hsc66/Hsc20 pueden funcionar como chaperona molecular y co-chaperona fue en *E. coli*, presentando actividad característica de ATPasa y solubilizando algunos agregados proteicos (Vickery y col., 1997; Silberg y col., 1998). El gen *hscB* se encuentra adyacente a *hscA* en los genomas antes mencionados, en *E. coli*, los genes *hscBAfdx* forman un operón, aunque hay evidencia de que *hscA* se transcribe independientemente (Kawula y Lelivelt, 1994). En el caso de las bacterias y levaduras, una ferredoxina es codificada río abajo del gen *hscA* y

ambos genes son transcritos como un operón (Seaton y Vickery, 1994) y (Dutkiewicz y col., 2003). Sugiriendo que el papel de las proteínas HscA/HscB es estabilizar proteínas que contienen grupos con centros Fe-S (Zheng y col., 1998).

Hesterkamp y Bokau (1998) investigaron el papel de la proteína HscA en *E. coli* y mostraron que no es estrictamente necesaria para el correcto plegamiento de proteínas recién sintetizadas, sugiriendo una función más especializada en la cual se involucra la ferredoxina que es codificada por el gen *fdx* río abajo de *hscA*. En *E. coli*, se ha encontrado que la transcripción del operón *hscBAfdx* es inducida por estrés al frío ("cold shock") y por la presencia del antibiótico cloramfenicol, mientras que el calor no lo induce; pero la proteína es mantenida en alto nivel en todas las condiciones probadas, incluyendo diferentes temperaturas. Este operón presenta una actividad en la solubilización de agregados de proteínas y el ensamble de grupos Fe-S. Sin embargo, en mutantes de *E. coli* en el gen *hscA* no fue observada alteración del fenotipo de crecimiento (Kawula y Lelivelt, 1994).

7. CARACTERIZACION DEL SISTEMA HscA/HscB.

7.1 Caracterización del sistema HscA/HscB en *P. aeruginosa*

En *P. aeruginosa* también ha sido identificado el gen *hscA* el cual forma parte de un operón constituido río arriba por el gen *hscB* y río abajo por el gen *fdx*. El arreglo genético de la región formada por el operón *hscBAfdx* de *P. aeruginosa* es similar al de *E. coli* y *S. cerevisiae* mostrando que pertenece a la familia de chaperonas moleculares Hsp70 con un 64% de identidad, aunque hay evidencia de que su regulación transcripcional difiere de la reportada en *E. coli* (Campos-García y col., 2000) (Figura 3). El papel propuesto para la proteína Hsp66 o HscA de *P. aeruginosa*, basado en su homología con otras proteínas de la familia Hsp70 y con la obtención de una mutante por la inserción de un transposón en el gen correspondiente, se sugiere estar involucrada en la asimilación y en la tolerancia a etanol. El papel propuesto en *P. aeruginosa* para la chaperona HscA es su

participación en la estabilización o el plegamiento de proteínas que son necesarias para la asimilación y tolerancia a etanol (Campos-García y col., 2000).

7.2 Caracterización del sistema HscA/HscB en *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* el sistema homólogo al de *P. aeruginosa* y *E. coli* HscA/HscB corresponde a la chaperona molecular SSQ1 y su co-chaperona JAC1, las cuales se les ha atribuido hasta el momento la función del ensamblaje de proteínas con centros Fe-S (Mühlenhoff y col., 2003) (Figura 3).

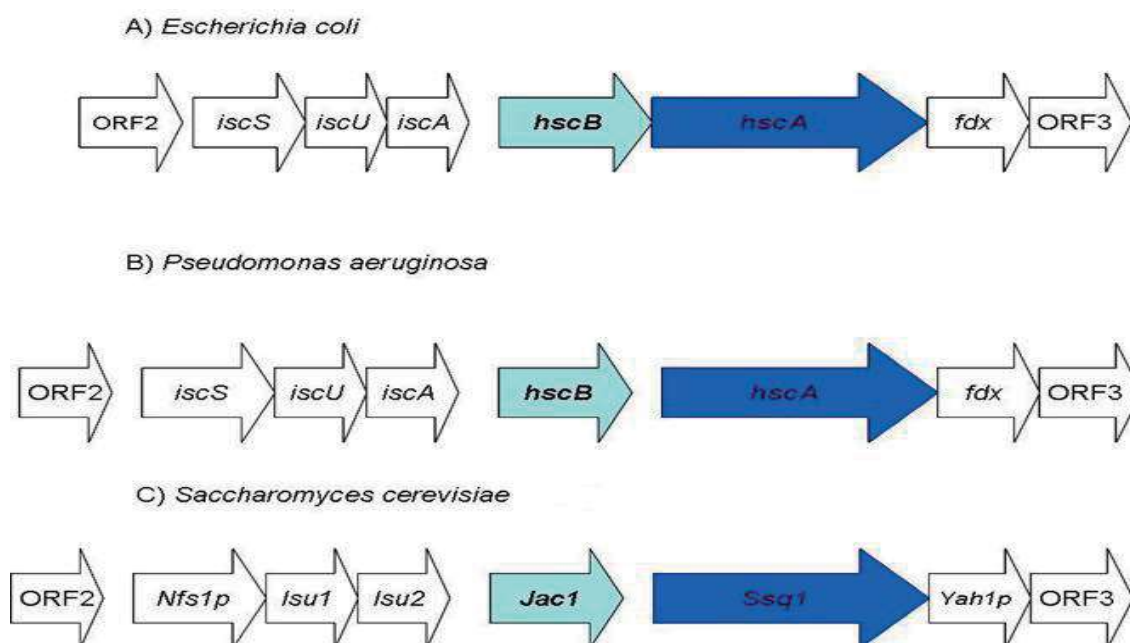


Figura 3. Arreglo genético del clúster *isc*. A) *E. coli* (adaptada de Takahashi y col., 1999), B) *P. aeruginosa* (adaptada de Campos-García y col., 2000) y C) *S. cerevisiae* (adaptada de Dutkiewicz y col., 2003). Las flechas indican el sentido de la transcripción/traducción.

8. GENES INVOLUCRADOS EN EL ENSAMBLAJE DE GRUPOS Fe-S

Recientemente fue demostrado que los genes *ssq1*, *jac1* y *yah1* forman parte de un grupo de nueve genes [ORF1-ORF2- *Nfs1p*-*isu1*-*isu2*-*jac1*-*ssq1*-*yah1p*-ORF3], conservados en varios organismos. Estos genes forman un grupo el cual fue designado *isc* (del inglés “iron-sulfur cluster”) debido a que ha sido demostrada

su participación en el ensamblaje de proteínas que contienen grupos Fe-S (Dutkiewicz y col, 2003).

La participación de la proteína HscA en el ensamblaje de proteínas Fe-S es necesaria por lo que se ha propuesto que puede actuar como una chaperona molecular, enfocándose en la función de estabilizar proteínas en su estado desplegado o asistiendo el plegamiento de las proteínas blanco con el grupo Fe-S (Dutkiewicz y col., 2003). Estudios indican que al menos seis genes del operón *isc* (*iscS*, *iscU*, *iscA*, *hscB*, *hscA* y *fdx*) son necesarios para la biogénesis de proteínas Fe-S en *E. coli* como: NADH deshidrogenasa I, aconitasa B, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, fumarasa A, FNR (proteína de reducción de fumarato nitrato), glutamato sintasa (GltS) y succinato deshidrogenasa (SDH) (Tukumoto y Takahashi, 2001).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Muhlenhoff y col, en 2003, se ha propuesto un modelo en *S. cerevisiae*, para la biogénesis de proteínas con centros Fe-S donde la cisteína desulfurasa (Nfs1p) remueve el azufre de la cisteína para formar alanina, quedando el azufre unido a la enzima. Después el azufre es reducido a S⁰ y la ferredoxina (Yah1p) produce el grupo Fe-S. El grupo prostético es liberado y transferido a apoproteínas con la posible ayuda de las proteínas Isu1 y Isu2. Finalmente la chaperona SSQ1 junto con su co-chaperona JAC1 se les ha sugerido la participación en el ensamblaje del grupo Fe-S a la proteína blanco (Figura 4).

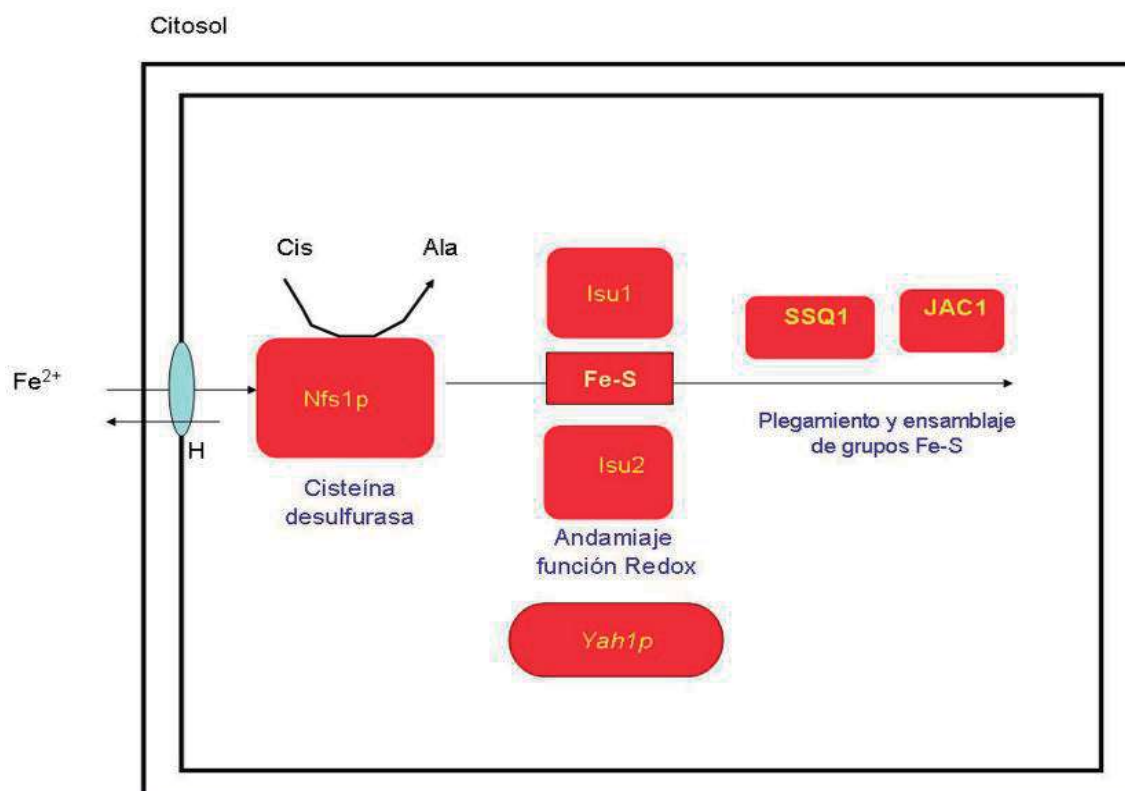


Figura 4. Modelo para la biogénesis de proteínas que contienen grupos Fe-S en *S. cerevisiae*. (Tomado de Muhlenhoff y col. 2003).

II. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

En el año 2000 Campos-García y col., observaron que al transformar con un plásmido conteniendo el operon *hscBAfdx* en una cepa mutante de *P. aeruginosa* W51M22, en el gen *hscA* que es incapaz de asimilar y tolerar etanol, recuperó su fenotipo, sugiriendo que estos genes están involucrados en el mecanismo de tolerancia a etanol.

En el 2002 Villagómez-Zavala clonó el operón *hscBAfdx* de *P. aeruginosa* y transformó una cepa etanologénica de *E. coli* KO11 reportando un notable aumento en el nivel de tolerancia a etanol en esta cepa, al ser transformada con el plásmido, sugiriendo que el operón *hscBAfdx* se encuentra involucrado en el mecanismo de tolerancia a etanol, tanto en *P. aeruginosa* como en *E. coli*.

En el 2004 Núñez-Pastrana, probó el efecto de la mutación del gen *hscA*, en estas cepas etanológicas KO11 y LY01 observando una disminución en la producción de etanol.

En el 2007 Resendiz-Tamayo, describe que la mutación del gen *hscA* en una cepa etanológica de *E. coli* LY01 disminuyó el nivel de tolerancia a etanol. Con respecto a la producción de etanol encontró que disminuyó (15 %) en la cepa mutante y aumentó al ser transformado con un plásmido que contenía los genes *hscA/hscB* (75 %). Adicionalmente, encontró que la mutación del gen *hscA* disminuyó la actividad enzimática así como la estabilidad de la alcohol deshidrogenada (ADHII), en la cepa etanológica LY01, sugiriendo que la participación del sistema de chaperonas moleculares HscA/HscB esta relacionada con la tolerancia y producción de etanol, probablemente mediante el plegamiento y estabilización de enzimas relacionadas con la síntesis del etanol.

III. JUSTIFICACION

Los estudios hasta ahora realizados muestran efectos del producto del gen *hscA* sobre el nivel de tolerancia y producción de etanol en bacterias como *E.coli* y *P. aeruginosa*. La finalidad del presente trabajo es conocer el efecto de la expresión de la chaperona molecular SSQ1 y la co-cahperona molecular JAC1 sobre el nivel de tolerancia y producción de etanol.

IV. HIPOTESIS

La expresión de la chaperona molecular *SSQ1* o la co-chaperona molecular *JAC1* aumentan la tolerancia y producción de etanol en cepas de levadura.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la expresión de la chaperona molecular *SSQ1* y co-chaperona *JAC1* sobre la tolerancia y producción de etanol en cepas de levadura.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Aislamiento y selección de levaduras productoras de etanol.
- 2.- Caracterización de las levaduras seleccionadas
- 3.- Identificación genética de las levaduras seleccionadas.
- 4.- Expresión de las proteínas *SSQ1* y *JAC1* en las levaduras seleccionadas.
- 5.- Evaluación del nivel de tolerancia y producción de etanol de las cepas transformantes.

VI. MATERIALES Y METODOS

A. CEPAS Y PLASMIDOS

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se encuentran enlistados en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
Levadura La Florencia M.R.	Levadura comercial	
UMARNAM5	Levadura aislada de vinazas de una destilería	Este trabajo
UMPe1	Levadura aislada del jugo de agave 12°Brix	Este trabajo
UMARN3	Levadura aislada del jugo de agave 12°Brix	Este trabajo
UMARNF1	Levadura aislada del jugo de agave 20°Brix	Este trabajo
UMARN9	Levadura para fermentación de vinos	Este trabajo
UMARNA2-1	Levadura aislada del jugo de agave	Este trabajo
UMARNAM2	Levadura aislada de vinazas de una destilería	Este trabajo
UMPE1 ura^-	Levadura <i>K. marxianus</i> auxótrofa a uracilo	Este trabajo
UMPE1 ura^- /PYES2(SSQ1)	Cepa UMPe1 ura^- transformada con el plásmido PYES2(SSQ1).	Este trabajo
UMPE1 ura^- /PYES3(JAC1)	Cepa UMPe1 ura^- transformada con el plásmido PYES3(JAC1).	Este trabajo
Plásmidos		
pYES2(SSQ1)	Plásmido que expresa la chaperona molecular SSQ1	Craig y col., (2003)
pYES3(JAC1)	Plásmido que expresa la co-chaperona molecular JAC1	Craig y col., (2003)

Plásmidos pYES.

Los plásmidos pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1) fueron donados por la Dra. Craig de la Universidad de Wisconsin del departamento de bioquímica E.V. El plásmido pYES2(SSQ1) tiene insertado en el sitio múltiple de clonación el gen que codifica la chaperona molecular SSQ1, y el plásmido pYES3 el gen de la co-chaperona molecular JAC1 (Figura 5).

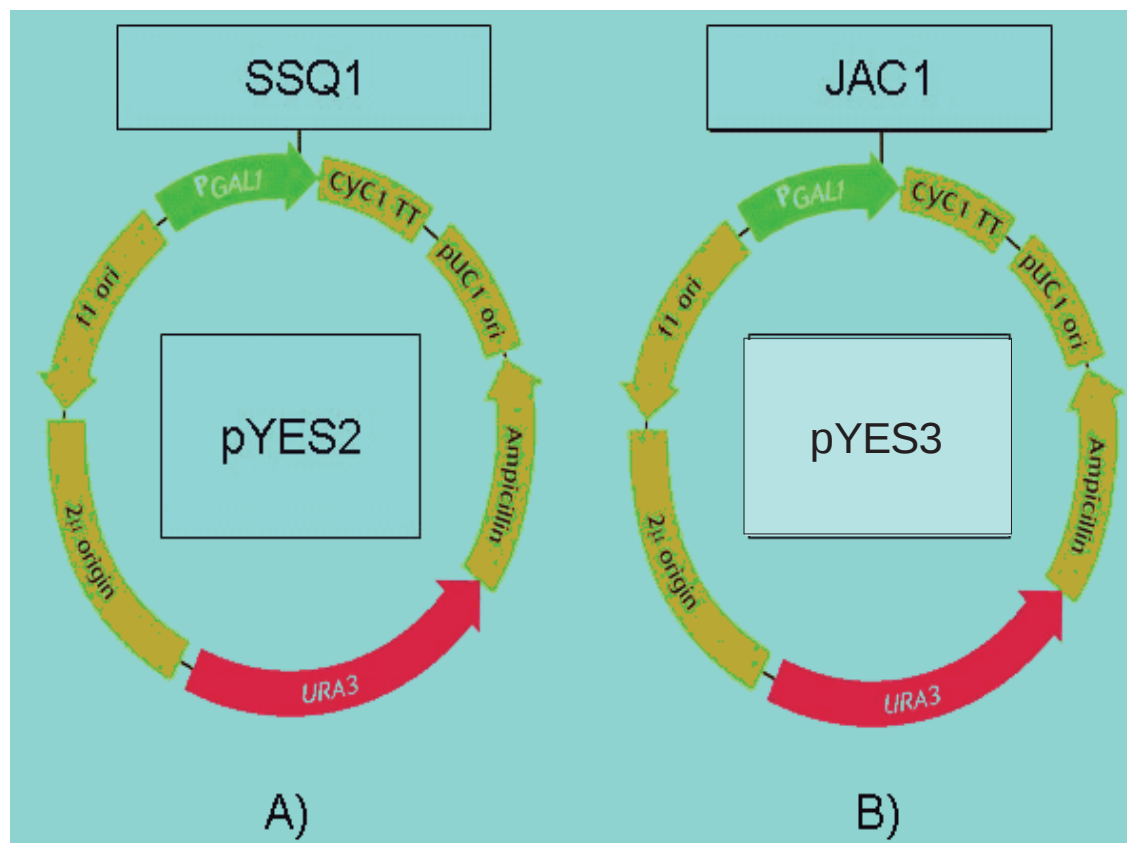


Figura 5. El plásmido A tiene clonado en el sitio múltiple de clonación, entre los sitios de restricción SacI-NotI, el gen que codifica la chaperona molecular SSQ1, y plásmido B entre los sitios de restricción SacI-BamHI, el gen para la co-chaperona JAC1. Los plásmidos cuentan con el marcador de selección de ampicilina para *E. coli*, y de auxotrofia para uracilo en levaduras (Ura3), con un promotor a glucosa y galactosa.

B. MEDIOS DE CULTIVO

Fueron utilizados tres medios de cultivo para crecer los microorganismos usados en este trabajo. Medio Luria-Bertani (LB), medio extracto de levadura, peptona de caseína y glucosa (YPD) y el medio de selección y mantenimiento de auxótrofas a uracilo (YNB-5FOA), cuya preparación se indica enseguida. Para los ensayos de fermentación se utilizó jugo de Agave.

1.- Medio sólido Luria-Bertani (LB).

Composición por litro de agua destilada (para el caso del caldo Luria CL no se le agregó agar):

Peptona caseína 10 gr.

Extracto de levadura 5 gr.

NaCl 5 gr.

Agar bacteriológico 15 gr.

El medio fue esterilizado 15 minutos a 121°C, posteriormente se dejó enfriar para la adición del antibiótico ampicilina (100 µg/ml).

2.- Medio YPD.

Composición por litro de agua destilada (para el caso del caldo no se le agrega agar):

Extracto de levadura 10 gr

Peptona de caseína 20 gr

Agar bacteriológico 15 gr

Glucosa 20 gr

El medio se esterilizó 15 minutos a 121°C, posteriormente se dejó enfriar para la adición de la glucosa esterilizada 5 min y se aforó a un litro (Amberg y col, 2005).

3.- Medio de selección de mutantes auxótrofos a uracilo (YNB)

Composición por litro de agua destilada (para el caso del caldo no se le agregó agar).

Base de nitrógeno sin aminoácidos (YNB) 6.7 gr (SIGMA-ALDRICH)

Mezcla de aminoácidos sin uracil (Drop out mix) 2 gr (SIGMA-ALDRICH)

Glucosa o galactosa 2 gr

Uracil (50 µg/ml) 50 mg (SIGMA)

Ácido fluororótico (5-FOA) 1 gr (ZYMO RESEARCH)

Agua destilada c.b.p. 1000 ml

Agar bacteriológico 20 gr

Se disuelven todos los componentes y se esterilizan a 15 libras de presión a 120°C durante 15 min. Por separado se esteriliza el agar: (Amberg y col., 2005).

Se utilizó el mismo medio de cultivo para el crecimiento y selección de de las levaduras transformadas con los plásmidos pYES2 (SSQ1) y pYES3 (JAC1), el medio fue preparado bajo las mismas condiciones, sin la adición de uracilo.

4.- Medios de almacenamiento.

A) Las cepas de *E. coli* que cuentan con los plásmidos pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1) fueron almacenadas en viales de 1.5 ml en medio LB y glicerol al 40% a -80°C.

B) Las cepas de levaduras aisladas fueron almacenadas en viales de 1.5 ml en medio líquido YPD 2% glucosa y glicerol al 20% a -80°C.

- C) Las cepas mutantes auxótrofas seleccionadas fueron almacenadas en viales de 1.5 ml en medio líquido con 5-FOA, uracilo y glicerol al 20% a -80°C.
- D) Las cepas transformadas con los plásmidos pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1) fueron almacenadas en viales de 1.5 ml en medio líquido sin uracilo y glicerol al 20% a -80°C.

5.- Medio de fermentación.

El jugo de Agave fue obtenido del *Agave tequilana* weber de la variedad azul, contiene un 60% de agua, 24% de inulina, 11% en fibras, 1.5% en azúcares reductores (glucosa y fructosa), 0.02% de proteína y 2.7% en cenizas. Una vez hidrolizado el Agave mediante cocimiento, el principal azúcar presente en el mosto de Agave es la fructosa.

C. METODOS.

1.- AISLAMIENTO DE LEVADURAS DEL JUGO DE AGAVE.

A partir de jugo de Agave de varias tequileras se diluyó con agua hasta obtener la concentración deseada (10, 12, 15, 20 y 40, °Brix) así mismo se preparó jugo de Agave a 10, 12, 15, 20, y 40 °Brix con adición de etanol al 10 y 15%, las concentraciones finales del jugo de Agave fueron determinadas con un refractómetro (ATAGO 01089). 100 ml del jugo de Agave a la concentración deseada se colocó en frascos estériles de 250 ml con adición de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y se dejó fermentar a temperatura ambiente, se realizaron 2 muestreos a las 24hrs y 48hrs, tomando 1.5 ml de cada fermentación. Posteriormente se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, y se espátularon 100

μl en cajas con medio solidó YPD 2% glucosa, incubándose las cajas a 30 °C durante 24 hrs.

2.- SELECCION DE LEVADURIFORMES.

Fueron seleccionadas las colonias crecidas en las cajas de petri con medio YPD 2% glucosa a las 24 hrs de crecimiento, las cuales fueron resembradas en cajas separadas de medio YPD 2% glucosa y se crecieron a 30 °C toda la noche, cada aislado fue marcado con una clave que indicaba la concentración de azúcares, concentración de etanol, dilución y tiempo de fermentación de la cual se aisló. Los aislados resembrados se picaron y se colocaron en cajas petri con medio YPD 2% glucosa, pararosinalina (2.5 mg/ml en 95% etanol) y bisulfito de sodio (100 mg por cada 200 ml de medio) para seleccionar las mejores fermentadoras (Conway y col, 1987).

3.- PARAMETROS DE SELECCION DE LOS AISLADOS

3.1 Crecimiento en medio YPD con diferentes concentraciones de glucosa.

Las pruebas de velocidad de crecimiento fueron realizadas en medio YPD líquido con concentraciones de glucosa del 2, 12 y 16% como fuente de carbono, posteriormente de un precultivo se utilizaron 100 μl para inocular una batería de tubos que contenían 4 ml de medio YPD líquido con la concentración de glucosa antes mencionada. La batería de tubos fue incubada por 18 hrs a 30°C con agitación en un rotador de tubos. El crecimiento se determinó mediante la densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro modelo JENWAY 6406 UV/VIS.

3.2. Análisis de osmotolerancia.

Las pruebas de osmotolerancia se realizaron en medio líquido YPD con concentraciones de glucosa del 10, 15, 20 y 25%, posteriormente de un precultivo

se añadieron 300 μ l para inocular una batería de tubos que contenía 10 ml de medio YPD con la concentración de glucosa antes mencionada. La batería de tubos se incubó por 18 hrs a 30°C con agitación en un rotador de tubos y el crecimiento se determinó mediante la determinación de la densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro modelo JENWAY 6406 UV/VIS.

3.3. Análisis de tolerancia a etanol.

Las pruebas de tolerancia a etanol fueron realizadas en medio líquido YPD con glucosa al 2%, con concentraciones crecientes de etanol, (5, 8, 10, 11 y 12%), posteriormente de un precultivo se agregaron 100 μ l para inocular una batería de tubos que contenía 4 ml de medio YPD 2% glucosa con las concentraciones de etanol mencionadas. La batería de tubos se incubó por 18 hrs a 30°C con agitación constante en un rotador de tubos. La tolerancia se determinó mediante la determinación de la densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro modelo JENWAY 6406 UV/VIS.

3.4. Determinación de la dosis letal 50 (DL 50).

De cultivos crecidos en YPD 2% de glucosa por 18 hrs sin etanol se les agregó etanol a diferentes concentraciones (5, 8, 10, 11 y 12%) se prepararon diluciones (1:10 y 1:100), a las cuales se les determinó la viabilidad celular, mezclando 50 μ l de azul de tripano al 0.4% y 50 μ l del cultivo diluido (1:10 y 1:100), se dejó reposar 5 min, y se colocaron 20 μ l en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de células viables (no teñidas con azul de tripano). Para determinar la dosis letal 50 (DL50) se graficó el número de células vivas contra la concentración de etanol.

3.5. Curva de viabilidad.

La curva de viabilidad a etanol fue realizada en medio líquido YPD con glucosa al 2% a una concentración de etanol del 11%. De precultivos preparados con anterioridad se añadieron 200 µl para inocular matraces que contenía 10 ml de medio YPD 2% glucosa, se incubaron a 30°C por 12 hrs con agitación constante y se verificó su crecimiento por cuantificación de la densidad óptica a 600nm en el espectrofotómetro modelo JENWAY 6406 UV/VIS. Después de verificar su crecimiento se adicionó el etanol necesario para lograr una concentración en el medio del 11%. Los matraces se incubaron a 30°C con agitación constante 150 rpm. Posteriormente se realizaron muestreos de 1 ml a los cuales se les determinó la viabilidad con el colorante azul de tripano como se describió anteriormente. Al finalizar el conteo se realizó un gráfico entre el porcentaje de células viables contra el tiempo a una concentración del 11% v/v de etanol.

3.6 Producción de etanol (Fermentación) con diferentes fuentes de nitrógeno.

La fermentación alcohólica se realizó utilizando jugo de Agave a una concentración de 16 °Brix en frascos de 250 ml que contenían 100 ml de jugo de Agave el cual fue esterilizado previamente a 15 lb de presión a 121°C durante 15 min, al medio de fermentación se le adicionaron diferentes fuentes de nitrógeno (sulfato de amonio, fosfato de amonio, cloruro de amonio y urea [0.8 gr/lit]) pH a 4.5. Partiendo de un precultivo se usaron 2 ml para inocular 100 ml de jugo de Agave a 16 °Brix en los frascos usados para fermentación, los cuales fueron incubados a 30°C con agitación constante a 150 rpm. Se realizaron muestreos de 1.5 ml.

3.7. DETERMINACION DE PARAMETROS DURANTE LA FERMENTACION ALCOHOLICA.

3.7.1 Cuantificación de azúcares y etanol.

Las muestras obtenidas de la fermentación fueron centrifugadas y filtradas (filtros para jeringa MILIPORE de 0.2µm) con el fin de eliminar restos celulares e impurezas. A partir de las muestras filtradas se realizaron diluciones (1:10) las cuales fueron inyectadas manualmente para su análisis en Cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC). La cuantificación de las muestras obtenidas de las fermentaciones se llevó a cabo en HPLC (VARIAN modelo pro star), se utilizó la columna de separación VARIAN (MetaCarb 87C 300 x 7.8 mm), el horno para calentar la columna fue el modelo 530 de ALLTECH, y el detector de índice de refracción utilizado fue el Perkin Elmer serie 200, la columna fue calentada hasta 80°C según especificaciones del fabricante. Para realizar el análisis de azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa) y el etanol producido, se realizó una curva de calibración determinando el área bajo la curva de los compuestos correspondientes ($R^2=0.999$).

3.7.2. Determinación de la población celular en la fermentación.

Para determinar el número de células y su viabilidad, se realizó un conteo a partir de las muestras obtenidas de las fermentaciones mencionadas anteriormente. Se prepararon diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, se tomaron 20 µl de las diluciones, y se colocaron en la cámara de Neubauer para realizar el conteo celular en microscopio (LEICA ATC 2000). Para determinar la viabilidad celular (no teñidas con azul de tripano), se mezclaron 50 µl de azul de tripano al 0.4% y 50 µl del cultivo diluido, se dejó reposar 5 min y se colocaron 20 µl en la cámara de Neubauer y se observó al microscopio. Para determinar la población celular se aplicó la siguiente formula, donde X representa la población celular (células / ml).

$$X = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de cuadros contados}} \times D \times (1/4 \times 10^6)$$

D= Dilución de la muestra.

4. MANIPULACION Y ANALISIS DE ACIDOS. NUCLEICOS.

4.1 Extracción de DNA total de levaduras.

Modificado de Guthrie, 2004.

- 1.- Crecer las levaduras en 3 ml de medio YPD 2% glucosa toda la noche.
- 2.- Cosechar el cultivo crecido en tubos eppendorff de 1.5 ml.
- 3.- Centrifugar a 13000 rpm, 1 min, y desechar el sobrenadante.
- 4.- Resuspender las células en 200 µl de buffer de lisis.
- 5.- Adicionar 0.3 gr de perlas de vidrio estériles (5 perlas) y 200 µl de la mezcla fenol-cloroformo 1:1 y vortexear a alta velocidad por 3 min.
- 6.- Adicionar 20 µl de buffer TE y vortexear a alta velocidad por 40 s.
- 7.- Centrifugar en micro centrifuga a 13000 rpm, 5 min y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
- 8.- Adicionar 500 µl de la mezcla etanol-isopropanol 60/40, mezclar muy bien por inversión y encubar en hielo 15 min.
- 9.- Centrifugar a 13000 rpm, 5 min, decantar y lavar con 500 µl de etanol al 70%.
- 10.- Centrifugar a 13000 rpm, 3 min, decantar y secar la pastilla.
- 11.- Resuspender la pastilla en 50 µl de agua destilada desionizada y esteril y adicionar 3 µl de RNAsa, incubar 30 min a 37°C.

4.1.1 Buffer de lisis

Triton (2%)

SDS (1%)

NaCl (100 mM)

Tris.Cl pH 8 (10 mM)

EDTA pH 8 (1 mM)

4.1.2 Buffer TE

Tris.Cl pH 8 (10 mM)

EDTA pH (1 mM)

4.2 Electroforesis en gel de agarosa.

Una vez aislado el ADN cromosomal de levaduras, se realizaron corrimientos electroforéticos en geles de agarosa al 1% disuelta en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M). Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal y se sumergieron en amortiguador TAE. Las muestras de ADN se mezclaron con azul de bromofenol en solución de glicerol al 30%, colocándose en los orificios del gel. Se permitió que el corrimiento electroforético procediera aplicando 130 voltios durante 30 min. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min y las bandas se observaron por medio de un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (fotodocumentador Vilbert Loumart). Como marcador de tamaño molecular de ADN lineal se utilizó el ADN del fago lambda digerido con las endonucleasas *EcoRI* y/o *HindIII*.

4.3 Amplificación de una región del gen que codifica al RNA ribosomal 26S.

A partir del DNA total de los aislados se prepararon reacciones de PCR para la amplificación de una región de 600 pb de una región el gen que codifica el RNA ribosomal 26S. Para este fin se utilizaron los oligonucleótidos NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (O'donnell, 1993).

En tubos para PCR se cargaron los siguientes componentes y concentraciones:

- 1.- Buffer [1X], 2.5 μ l.
- 2.- DNTPs [10 mM], 0.70 μ l.
- 3.- $MgSO_4$ [1 mM], 0.5 μ l.
- 4.- Oligonucleótidos [30 pmol c/u], 3 μ l c/u.
- 5.- DNA total 300 ng.
- 6.- Polimerasa platinum *Pfx* [1 unidad], 0.4 μ l.
- 7.- Agua destilada esteril 9.9 μ l.

Las condiciones para el PCR fueron: desnaturalización 2 min a 94°C, 1 min a 94°C, alineamiento 40 s a 52°C, extensión 2 min a 68°C durante 35 ciclos y 7 min a 68°C. Una vez obtenidos los productos de PCR, se realizaron corrimientos electroforéticos en geles de agarosa al 1% y como marcador de tamaño molecular se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb plus (escalera de Invitrogen), el cual nos permitió verificar los tamaños en los productos.

4.3.1 Limpieza de los productos de PCR.

La limpieza de los productos de PCR obtenidos se realizó con el quit WIZARD PURIFICATION SYSTEM de Promega, utilizando el protocolo recomendado por el fabricante.

4.3.2 Secuenciación de los productos de PCR.

La secuenciación de los productos de PCR, fue realizada en el Cinvestav unidad Irapuato.

4.3.3 Análisis tipo Blast.

El análisis tipo Blast se realizó en la base de datos del centro nacional de información biotecnológica (NCBI), con la herramienta de búsqueda básica local de alineamientos (Blast), la cual localiza regiones de similitud entre secuencias con el uso de nucleótidos. El programa nos permitió comparar las secuencias obtenidas con las existentes en su base de datos y el mismo programa realizó los cálculos estadísticos. Con el algoritmo denominado Neighbor joining en la misma base de datos se obtuvieron los dendogramas y árboles filogenéticos correspondientes.

5.- SELECCION DE MUTANTES AUXOTROFAS A URACILO.

Para la selección de cepas auxótrofas a uracilo denominadas ura^- , se utilizó el medio mínimo de selección YNB con aminoácidos, agregando el ácido fluororótico denominado (5-FOA) (Boeke y col, 1984). A partir de preinóculos se espátularon de 100 μ l a 1000 μ l en cajas de petri con medio solidó YNB, aminoácidos, uracilo y 5-FOA, se incubaron a 30°C de 24 a 48 hrs hasta observar la aparición de colonias. Con el fin de confirmar que realmente se seleccionaron levaduras ura^- , éstas se sembraron en el mismo medio de selección (YNB 5-FOA).

6. Transformación de la cepa auxótrofa a uracilo UMPe1 ura^- con los plásmidos pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1).

6.1 Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina.

Los plásmidos a utilizar para la transformación de las auxótrofas a uracilo, se aislaron como se describe a continuación.

- a) El cultivo de *E. coli* conteniendo el plásmido fue crecido en caldo luria toda la noche a 30°C con agitación constante, 4 ml fueron centrifugados a 12 000

rpm en una microcentrífuga Eppendorf 5415C por 1 min, para sedimentar las células.

- b) Se descarto el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de solución TE [Tris (tris [hidroximetil] aminometano)-HCl 10 mM pH 8.0], EDTA [(ácido etilendiaminotetracético) 1 mM y NaCl 100 mM] y se centrifugó 30 segundos.
- c) El sobrenadante fue desechado y la pastilla resuspendida en 100 µl de STE (Sacarosa 50 mM, Tris 25 mM y EDTA 10 mM a pH 8.0), se agregaron 20 µl de lisozima 20 mg/ml y se incubó 5 min a 37°C.
- d) Se agregaron 200 µl de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N, SDS (dodecil-sulfato de sodio) 1% mezclado suavemente y se incubó 10 min en hielo.
- e) Fueron adicionados 150 µl de una solución 3 M de acetato de sodio a pH 4.8, se incubó 10 min en hielo y posteriormente centrifugado a 12 000 rpm por 5 min.
- f) El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregaron 500 µl de la mezcla fenol/cloroformo (25/25), fue mezclado en vortex moderadamente y centrifugado 5 min a 12 000 rpm.
- g) La fase superior se transfirió a otro tubo y se repitió el paso anterior.
- h) La fase superior se transfirió a otro tubo y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se incubó 30 min a -25°C.
- i) Se centrifugó a velocidad máxima por 15 min desechando el sobrenadante y la pastilla fue lavada tres veces con etanol al 70%. La pastilla fue secada y resuspendida en 50 µl de agua estéril, con 3 µl de RNAsa y se incubaron a 37°C por 30 min.
- j) Las muestras fueron almacenadas a -20°C o sometidas a corrimiento electroforéticos en geles de agarosa.

6.2. Preparación de células electrocompetentes de levadura UMPe1ura⁻.

Modificado de Guthrie (2004).

- 1.- Se crecieron las cepas de levadura en 500 ml de medio líquido YPD 2% glucosa, incubando toda la noche a 30°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 1.3 a 1.5 a 600 nm (1×10^8 células por ml).
- 2.- El cultivo se dividió en 2 botellas de centrifuga de 250 ml cada una y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante.
- 3.- Se resuspendió la pastilla formada en 250 ml de agua fría estéril.
- 4.- Se centrifugó a 5000 rpm por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante.
- 5.- Se repitió el paso anterior y se dividió en alícuotas de 125 ml.
- 6.- Se resuspendió la pastilla en 20 ml de una solución fría 1 M de sorbitol (182 g/lit en agua destilada esteril) y se transfirió a tubos falcón estériles de 30 ml.
- 7.- Se vortexeo para lograr la resuspensión total y con una pipeta estéril se transfirieron las células resuspendidas a tubos de micro centrifuga de 1.5 ml.
- 8.- Se centrifugaron a 5000 rpm, 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante.
- 9.- Se resuspendió la pastilla con 0.5 ml de la solución 1 M de sorbitol frío y las muestras se guardaron en hielo.

6.3 Electroporación de las células electrocompetentes de la levadura UMPe1ura-.

Modificado de Guthrie (2004).

- 1.- A las células competentes de levadura (40 μ l) se le adicionaron 100 ng de DNA plásmidico, se mezclaron y se incubaron 5 min en hielo.
- 2.- La mezcla se transfirió a una cubeta para electroporacion estéril de 0.2 cm.
- 3.- Se utilizó el electroporador BIO RAD micro pulser y se aplicó un pulso de 1.5 KV.
- 4.- Inmediatamente se adicionó 1 ml de la solución de sorbitol 1 M fría y usando una pipeta se mezcló perfectamente.
- 5.- Inmediatamente se procedió a sembrar las células electroporadas en el medio de selección, el cual contiene la concentración de 1 M de sorbitol con el fin de eliminar lo más posible el choque salino para las células electroporadas.

6.4 Selección de levaduras transformantes UMPe1ura⁻/PYES2 (SSQ1) y UMPe1ura⁻/PYES3 (JAC1).

Después de transformar las células competentes con el plásmido pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1), se espátularon 1000 µl de muestra en cajas de petri con 25 ml de medio solidó YNB, aminoácidos, glucosa al 2%, uracilo. Los cultivos se incubaron a 30°C por un lapso de 24 a 48hrs hasta la aparición de colonias. Las cuales se resembraron en el mismo medio de selección por auxotrofia a uracilo.

Utilizando la metodología descrita por fink y col, se extrajo DNA total de las levaduras transformadas, se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* (JM101) con 100 ng del DNA, las cuales fueron seleccionadas por la resistencia a ampicilina conferida por los plásmidos pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1). De las transformantes de *E. coli* se realizó el aislamiento de los plásmidos por lisis alcalina. Una vez obtenidos los plásmidos se les realizó un análisis de restricción, para lo cual se utilizaron las enzimas XhoI y KpnI para el plásmido pYES2(SSQ1), y EcoI y KpnI para el plásmido pYES3(JAC1).

VII. RESULTADOS

1. AISLAMIENTO DE LEVADURAS DEL JUGO DE AGAVE.

Se aislaron un total de 89 levaduriformes de varias fermentaciones espontáneas en jugo de Agave de diferentes tequileras, vinazas de destilería y de jugo de Agave amargo, las cuales contenían la concentración de azúcares y etanol descrita en la tabla 3. Se realizaron dos muestreos, a las 24 y 48 hrs de fermentación. Los 89 levaduriformes obtenidos se prepararon para un ensayo de producción de etanol en medio YPD con 2% de glucosa y pararosinalina así como en jugo de Agave para determinar si son productores de etanol, ya que algunos de los aislados obtenidos durante el aislamiento pudieron haber sobrevivido bajo esas condiciones de fermentación espontánea pero no son eficientes productores de etanol.

Tabla 3. Aislados del jugo de Agave. En la tabla se muestra la condición a la cual se llevo a cabo el aislamiento de los microorganismos potencialmente fermentadores y el nombre designado a cada uno de los aislados.

CONDICIÓN	AISLADOS
	Después de 24hrs de fermentación
20° Brix	A, B, C, D
15° Brix	E, F, G, H
10° Brix	I, J, K, L, M
20° Brix / 15% ETOH	N, P, O
20° Brix / 10% ETOH	O11
15° Brix / 15% ETOH	Q, R, S,
15° Brix / 15% ETOH	T, U, V, W,
10° Brix / 10% ETOH	X, Y, Z,
	Después de 48hrs de fermentación
40° Brix	A1, B1
20° Brix	C1, D1, E1, F1
15° Brix	G1, H1, I1, J1
10° Brix	K1, L1, M1
20° Brix / 15% ETOH	N1, O1, P1, Q1, R1, S1

20° Brix / 10% ETOH	T1, U1, V1
15° Brix / 15% ETOH	W1, X1
15° Brix / 10% ETOH	Y1, Z1, A2-1, A2-2, B2, C2
10° Brix / 15% ETOH	D2, E2, F2, G2, H2, I2,
10° Brix / 10% ETOH	J2, K2, L2, M2, N2
12° Brix	3, 6, 7, 8, 2n, 2p, 3p, 5p, 6p, 7p
Jugo de Agave amargo fermentado	Am1, Am2, Am3, Am4, Am5, Am6
Vinazas	Pe1, Pe2, Pe3, Pe4
Cepa para fermentación de vinos	9
Comercial	Panadería (Comercial)

1.2 Selección de los aislados productores de etanol.

Para la selección de los levaduriformes obtenidos que productores de etanol, se utilizó el medio sólido YPD 2% glucosa, adicionado con pararosinalina y bisulfito de sodio, los cuales se colocaron por picadura en el medio y se seleccionaron como productores de etanol aquellos aislados que mostraron un halo de color rosa sobre el medio indicando de manera indirecta una alta eficiencia en la fermentación alcohólica. De este ensayo se identificaron como mejores productoras de etanol 12 de los 89 aislados (B, A2-1, F1, C.f, Pe1, 3, Am2, Am5, 7, 8, Pe2, Pe3, Pe4) ya que mostraron un halo de producción de etanol (dato no mostrado). A los 12 de los 89 aislados seleccionados como productores de etanol, se les realizó un análisis de fermentación en medio líquido YPD con glucosa al 16% (dato no mostrado), de las cuales se determinó la concentración de etanol producido por cada uno mediante cromatografía de gases, con la finalidad de seleccionar los mejores productores de etanol por fermentación alcohólica. De este ensayo fueron seleccionados los aislados Pe1, 3, Am2, Am5.

2. PARAMETROS DE SELECCION DE LOS AISLADOS

2.1 Crecimiento en medio YPD con diferentes concentraciones de glucosa.

Con la finalidad de determinar el efecto ocasionado en la velocidad de crecimiento de cada aislados a diferentes concentraciones de glucosa, a los 4 aislados (Pe1, 3, AM2, AM5), seleccionados como productores de etanol, las cepas de referencia, panadería y 9, se les realizó un ensayo de crecimiento en medio líquido YPD con glucosa a diferentes concentraciones (Figura 6).

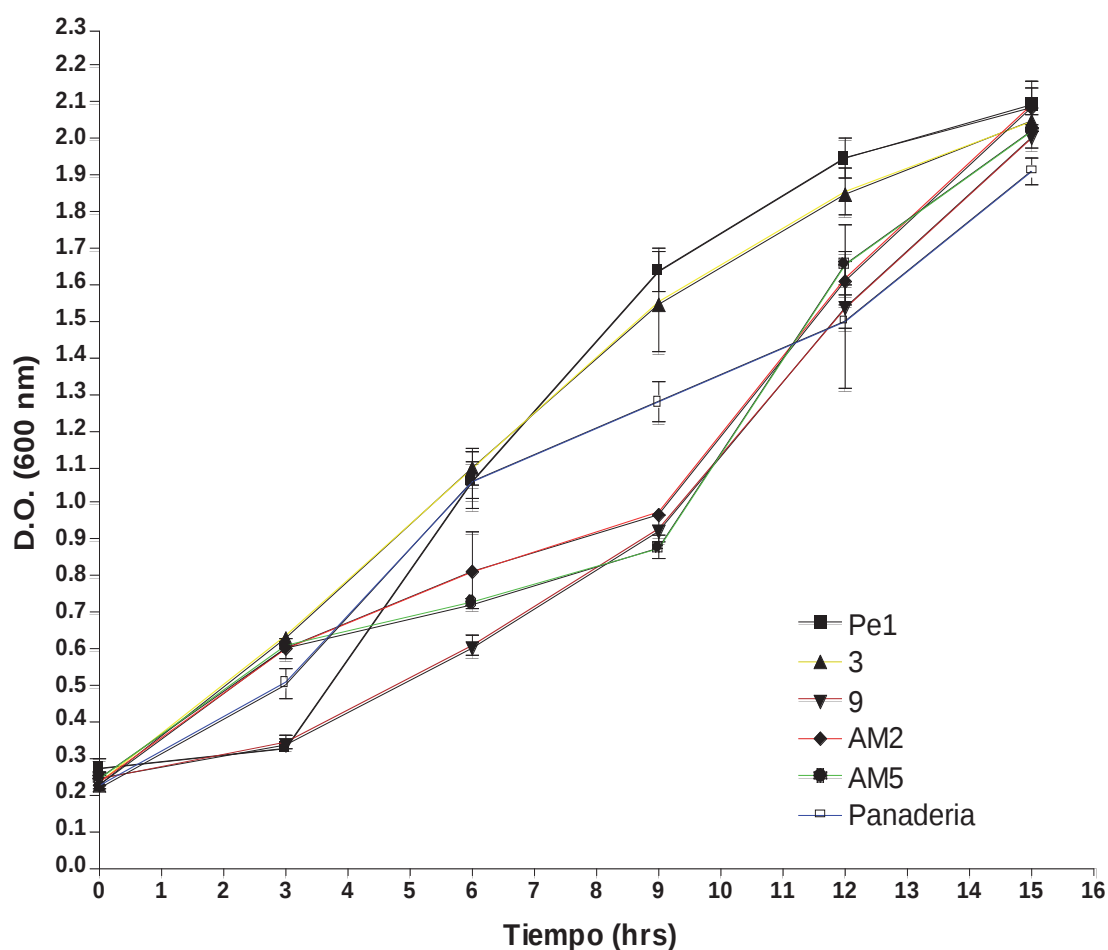


Figura 6. Análisis de crecimiento realizados en medio YPD 2% de glucosa de las cepas aisladas con agitación constante a 30°C, durante 18 hrs. La densidad óptica se midió a 600 nm. n=3.

A partir de las curvas de crecimiento se calculó el tiempo de duplicación de cada cepa para determinar su velocidad de crecimiento, por medio de la formula descrita en los materiales y métodos en el apartado 3.7.3.

De este análisis se obtuvo que los aislados Pe1 y 3 tuvieron un tiempo de duplicación menor lo que represento una mayor velocidad de crecimiento comparada con el resto de los aislados (AM2, AM5 y las levaduras 9, panadería), ya que mostraron el menor tiempo de duplicación a las diferentes concentraciones probadas teniendo un crecimiento más eficiente bajo las diferentes concentraciones de glucosa utilizadas (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados obtenidos de los análisis de crecimiento con diferentes concentraciones de glucosa.

	Glucosa (2%)			Glucosa (12%)			Glucosa (16%)		
Aislado	Pob	μ_{max}	Td	Pob	μ_{max}	Td	Pob	μ_{max}	Td
	($\times 10^6$)	(hr^{-1})	(hr)	($\times 10^6$)	(hr^{-1})	(hr)	($\times 10^6$)	(hr^{-1})	(hr)
Pe1	130	0.24	2.9	140	0.20	3.4	144	0.20	3.5
3	130	0.28	2.5	134	0.19	3.6	137	0.21	3.2
9	127	0.18	3.8	124	0.15	4.6	128	0.14	5
AM2	130	0.18	3.8	142	0.16	4.3	126	0.18	3.8
AM5	130	0.17	4	131	0.17	4	121	0.18	3.8
Panadería	119	0.18	3.8	127	0.15	4.6	121	0.14	5

Pob = Población (celulas/ml), μ_{max} = Velocidad máxima de crecimiento hr^{-1} , Td = Tiempo de duplicación.

2.2. Análisis de osmotolerancia.

Se realizó un ensayo de osmotolerancia, con los aislados (Pe1, 3, AM2, AM5, 9 y Panadería), seleccionados como productores de etanol, con la finalidad de conocer la concentración máxima de glucosa tolerable por los aislados y su efecto sobre la velocidad de crecimiento.

Del ensayo se obtuvo que los aislados Pe1, 3 y la cepa de panadería no fueron afectados por las concentraciones de glucosa utilizadas, ya que estas

levaduras mostraron la velocidad de crecimiento mayor y el menor tiempo de duplicación (Figura 7). El resto de los aislados fueron afectados en su velocidad de crecimiento a concentraciones mayores del 15% de glucosa ya que su tiempo de duplicación fue mayor al presentado por los aislados Pe1, 3 y panadería (Tabla 5). A partir de estos resultados se determinó que los aislados Pe1, 3 y panadería fueron los más osmotolerantes llegando a tolerar hasta una concentración del 25% de glucosa y el resto de los aislados mostraron una tolerancia máxima a una concentración de glucosa del 15% siendo denominados como menos osmotolerantes.

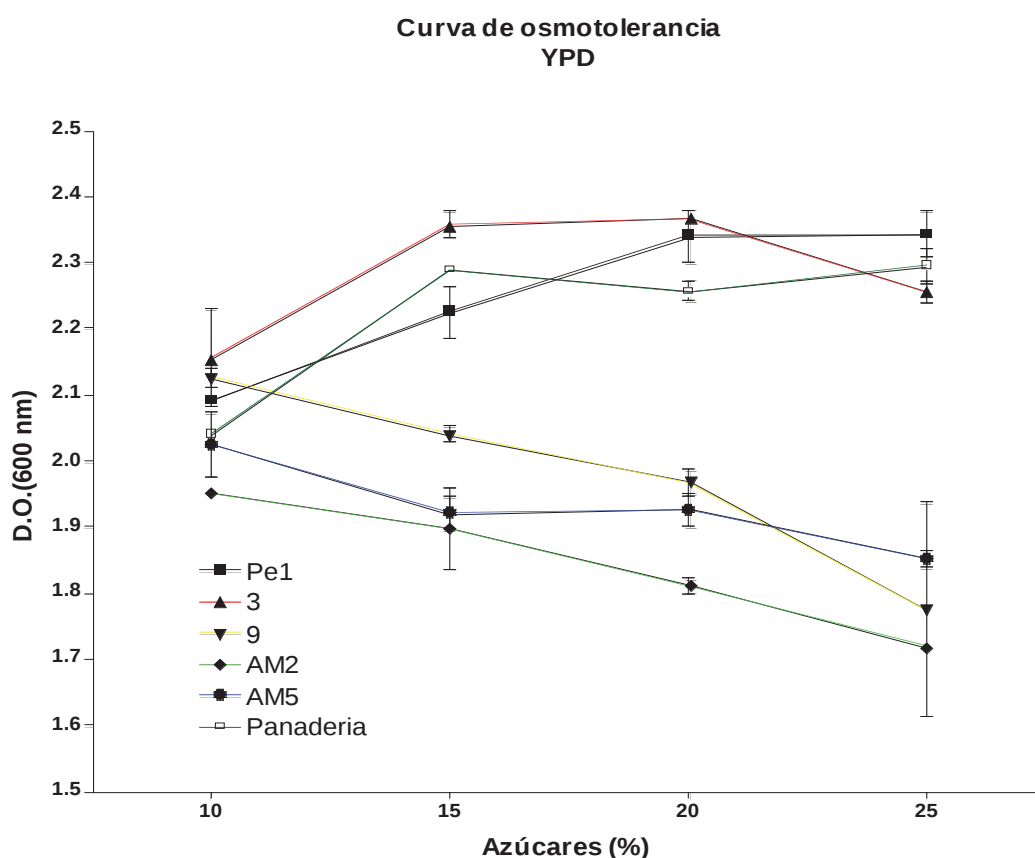


Figura 7. Curva de osmotolerancia realizado en medio YPD con 10, 15, 20 y 25% de glucosa con agitación constante a 30°C, durante 18 hrs. La densidad óptica se midió a 600 nm. n=3.

Tabla 5. Resultados obtenidos del ensayo de osmotolerancia.

	Glucosa (10%)			Glucosa (15%)			Glucosa(20%)			Glucosa (25%)		
Aislado	Pob	μ_{max}	Td	Pob	μ_{max}	Td	Pob	μ_{max}	Td	Pob	μ_{max}	Td
	(X10⁶)	(hr⁻¹)	(hr)	(X10⁶)	(hr⁻¹)	(hr)	(X10⁶)	(hr⁻¹)	(hr)	(X10⁶)	(hr⁻¹)	(hr)
Pe1	135	0.24	2.9	145	0.27	2.5	152	0.28	2.5	152	0.28	2.5
3	140	0.25	2.7	153	0.28	2.5	153	0.28	2.5	146	0.27	2.5
9	138	0.25	2.7	132	0.23	3	128	0.22	3.1	120	0.19	3.6
AM2	126	0.22	3.1	123	0.21	3.3	117	0.19	3.6	112	0.18	3.8
AM5	132	0.23	3	125	0.21	3.3	125	0.21	3.3	120	0.20	3.4
Panadería	133	0.23	3	149	0.27	2.5	146	0.27	2.5	149	0.28	2.5

Pob = Población (celulas/ml), μ_{max} = Velocidad máxima de crecimiento hr-1, Td = Tiempo de duplicación.

2.3. Tolerancia a etanol.

Para determinar la tolerancia a etanol de los aislados (Pe1, 3, AM2, AM5 y los controles) se determino el crecimiento de estos después de 18 hrs de incubación en medio líquido YPD con 2% de glucosa y etanol a las diferentes concentraciones a probar (0 al 12%). Los aislados Pe1, 3, la levadura 9 y la de panadería mostraron una tolerancia al etanol a una concentración del 10%, mientras que el aislado AM5 mostró una tolerancia a una concentración de etanol del 9% y el aislado AM2 mostró una tolerancia al etanol del 8% (Figura 8). Estos resultados fueron confirmados al determinar la D.O. de los cultivos a las diferentes concentraciones de etanol usadas, con las cuales se determino la concentración inhibitoria 50, observando que a los aislados más tolerantes perdieron la mitad de su densidad óptica a una concentración de etanol del 10%, lo que indica que fue inhibido el crecimiento celular a esa concentración en un 50%. Por lo que se determinó como los más tolerantes a los aislados Pe1, 3, la cepas 9 y la cepa de panadería y como los menos tolerantes a los aislados AM5 y AM2 (Tabla 6). Estos

resultados obtenidos muestran que a concentraciones de etanol del 10% o mayores se convierte en tóxico para las células inhibiendo el crecimiento de las levaduras al final del experimento y se determino la concentración máxima tolerable de etanol por cada aislado.

Tabla 6. Concentración inhibitoria 50 obtenida de la figura 8.

Aislado	C.I. 50 (%) Etanol
Pe1	10
3	10
9	10
AM2	8
AM5	9
Panadería	10

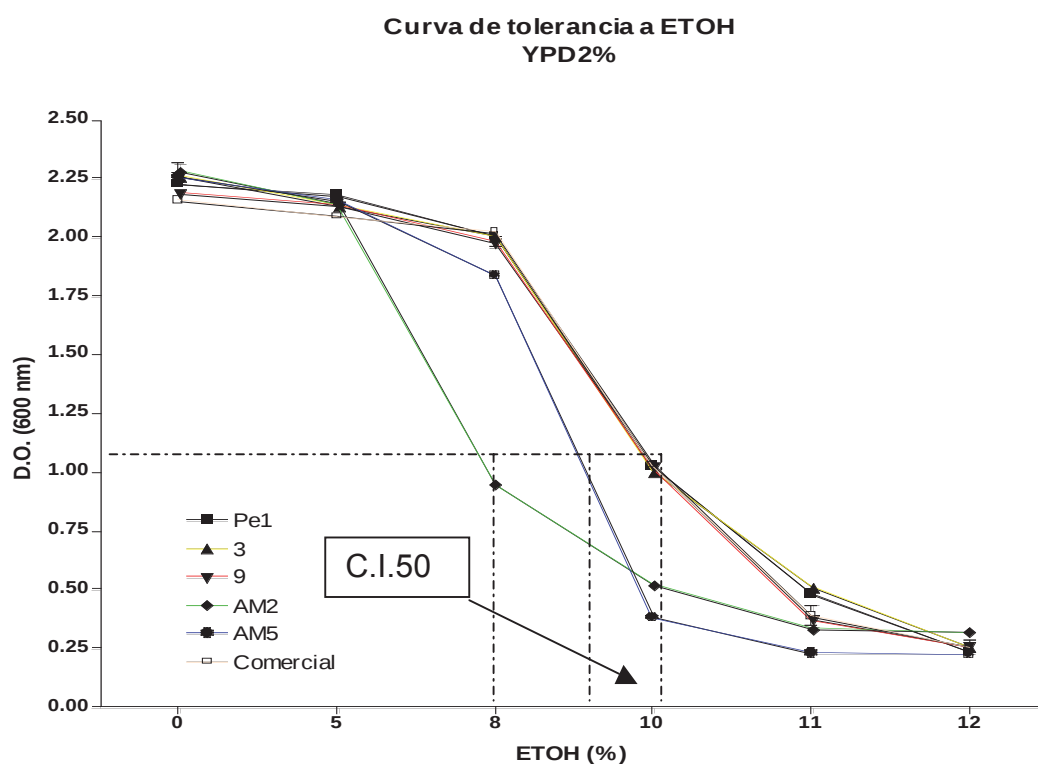


Figura 8. Curva de tolerancia a etanol, obtenida en medio YPD con 2% de glucosa y etanol al 0, 5, 8, 10, 11 y 12% (v/v), con agitación constante a 30°C, durante 18 hrs. El crecimiento se determino midiendo la densidad óptica a 600 nm. n=3.

2.4. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la fermentación alcohólica de jugo de Agave.

De las fermentaciones con diferentes fuentes de nitrógeno, se realizaron muestreos los cuales al ser analizados mostraron que la mayor producción de etanol se obtuvo cuando se utilizó sulfato de amonio en todas las fermentaciones con los diferentes aislados, así como en los controles, siendo el aislado Pe1 el que mostró la mayor producción de etanol con las diferentes fuentes de nitrógeno probadas (Tabla 7). Al realizar el análisis de consumo de azúcares con respecto a la producción de etanol en la fermentación adicionada con sulfato de amonio por ser la fuente de nitrógeno utilizada donde se tubo la mayor producción de etanol, se determinó también que el aislado Pe1 fue el mas eficiente por presentar el mayor rendimiento en producción de etanol (tabla 8). A partir de estos resultados fue seleccionado el aislado Pe1 y como fuente de nitrógeno el sulfato de amonio para los siguientes ensayos.

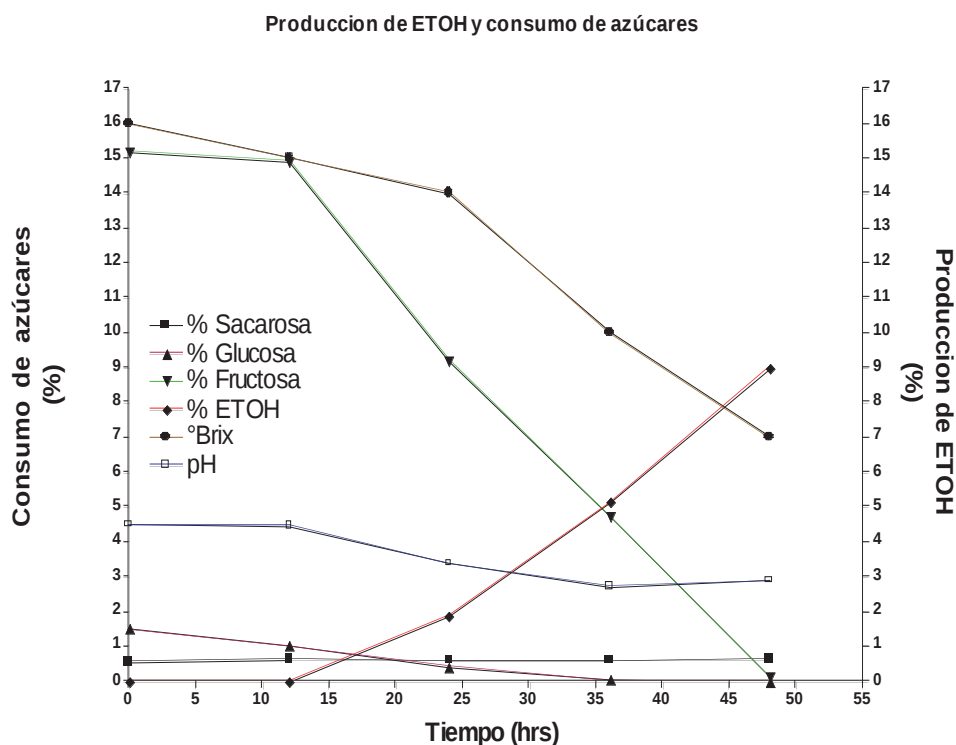


Figura 9. Curva de producción de etanol en jugo de Agave a 16 °Brix con adición de diferentes fuentes de nitrógeno. Durante 48 hrs con agitación constante a 30°C, pH a 4.5, los muestreos fueron analizados por HPLC. Se muestra sólo las curvas obtenidas con sulfato de amonio para el aislado Pe1, n=3.

Tabla 7. Resultados de la producción de etanol en jugo de Agave con diferentes fuentes de nitrógeno. Los porcentajes del etanol producido se determinó mediante HPLC.

Fuente de nitrógeno	ETANOL PRODUCIDO			
	(% v/v)			
	Pe1	3	AM2	panadería
Sulfato de amonio (0.8 gr/lit)	9.2	8.5	8.5	8.1
Fosfato de amonio (0.8 gr/lit)	8.5	8.1	7.9	7.9
Cloruro de amonio (0.8 gr/lit)	8.6	8.1	7.9	7.8
Urea (0.8 gr/lit)	8.5	7.9	7.8	7.9

Tabla 8. Producción de etanol en jugo de Agave con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

Aislado	% Azúcares iniciales	% Sac	% Glu	% Fruc	Pob (x10 ⁶)	Biomasa g/l	Td (hr)	(%) Etanol producido	Ys/p (%)
Pe1	17	0.523	0	0.900	198	23	2.76	9.2	84
3	17	0.505	0	0.100	199	23.1	2.65	8.5	78
AM2	17	0.512	0	0.040	156	18.13	3.45	8.5	78
Panadería	17	0.500	0	0.078	189	21.9	2.87	8.1	74

Fermentación 48 hrs, a 30°C, en jugo de Agave a 16 °brix, los porcentajes de azúcares remanentes y producción de etanol fueron determinados en HPLC. Sac = sacarosa, Glu = glucosa, Fruc = Fructosa, Td = tiempo de duplicación, Pob = población, μ_{max} = Velocidad máxima de crecimiento, Ys/p = sustrato sobre producto (Rendimiento) (n=3).

3. IDENTIFICACION GENETICA DE LOS AISLADOS.

La identificación genética se realizó con la finalidad de determinar el género y la especie de cada uno de los aislados seleccionados como productores de etanol y poder determinar el tipo de levadura con el cual se trabajó, para esto se realizó la extracción de DNA total de cada uno de ellos por el método modificado

de Raeder y Broda en 1985, el cual se describe en los materiales y métodos (Figura 10).

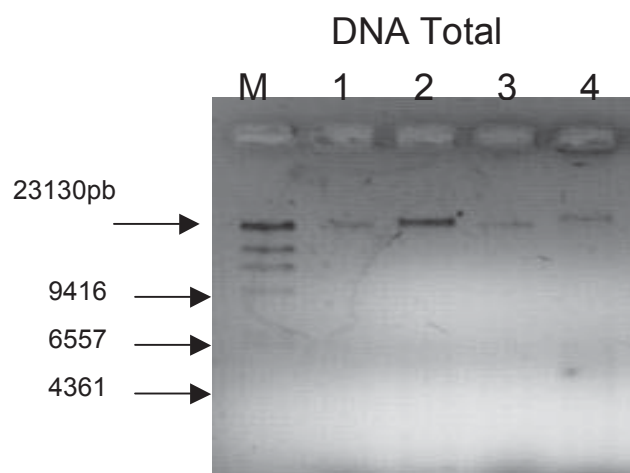


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del corrimiento del DNA total de los aislados. M= marcador de peso molecular λ -HindIII, DNA total de levaduras Carril 1) Pe1, 2) 3, 3) AM2 y 4) AM5.

De la extracción total del DNA de los aislados se cargaron 10 μ l de muestra en gel de agarosa al 1%, como lo muestra la figura 10 donde se encontró una banda de alrededor de 23,000 pb, correspondiente al DNA total de levaduras. A partir del DNA obtenido se prepararon reacciones de PCR, utilizando un juego de oligonucleótidos específicos [NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG)] para amplificar un fragmento de 600 pb pertenecientes a una región del gen que codifica al RNA ribosomal 26S, los productos de la amplificación se muestran en la Figura 11.

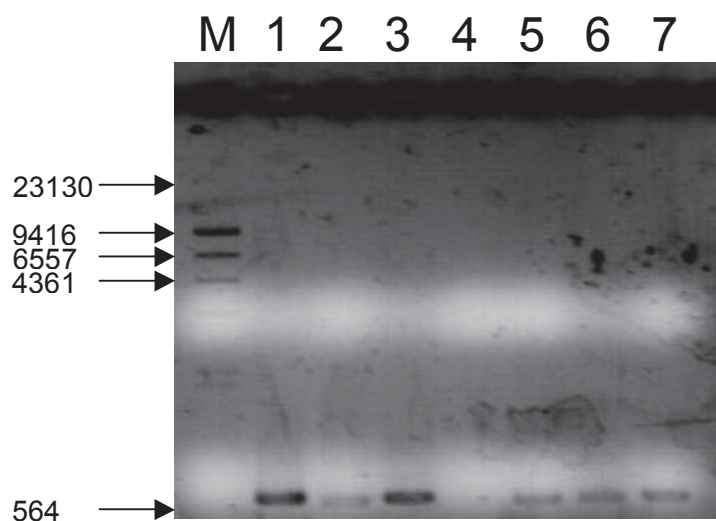


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR. M= marcador de peso molecular λ -HindIII, Carril 1) aislado Pe1, 2) aislado 3, 3) aislado AM2, 4) aislado AM5, 5) aislado 9, 6) aislado F1, 7) aislado A2-1. Cabe mencionar que para esta amplificación se utilizaron 2 aislados más (F1 y A2-1).

Los fragmentos obtenidos por PCR se limpiaron para ser enviados a secuenciación. Después de la secuenciación se realizó un análisis de alineamiento con los fragmentos secuenciados utilizando el programa BLAST, del cual a partir de los alineamientos realizados y utilizando el algoritmo Neighbor joining, se obtuvo un dendograma con cada uno de los fragmentos secuenciados. En la Figura 12 se muestra el dendograma de uno de los fragmentos analizados perteneciente al aislado Pe1, el cual mostró pertenecer a una levadura perteneciente a la especie *Kluyveromyces marxianus*, así mismo se realizó un árbol filogenético el cual se muestra en la Figura 13, el cual arrojó como resultado que el fragmento analizado mostraba una relación evolutiva con las levaduras *Kluyveromyces marxianus*, por lo que éstos análisis sugieren que el aislado Pe1 pertenece a una levadura del género *Kluyveromyces*, especie *marxianus*.

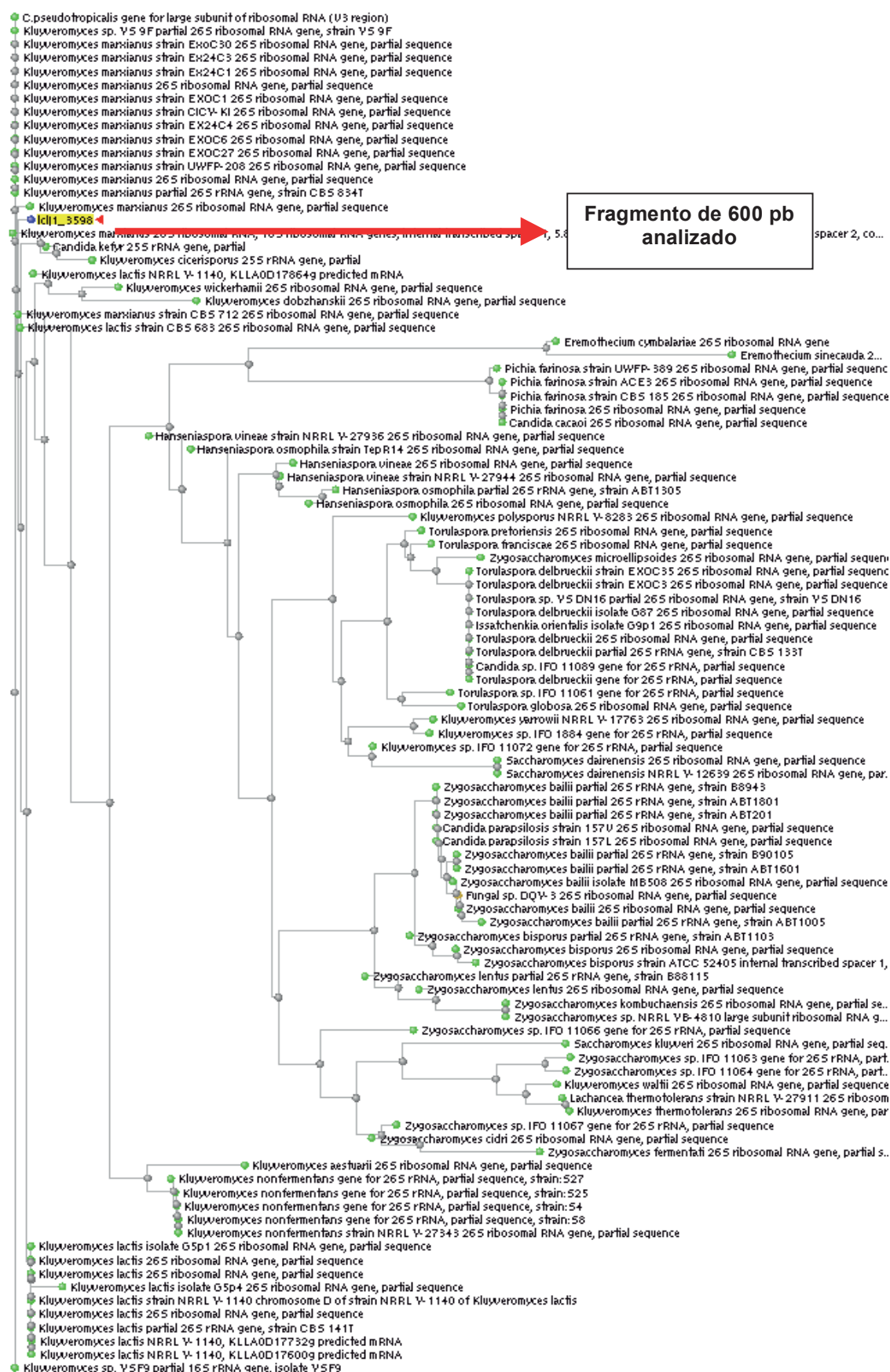


Figura 12. Dendograma obtenido de la secuencia de 600pb pertenecientes al aislado

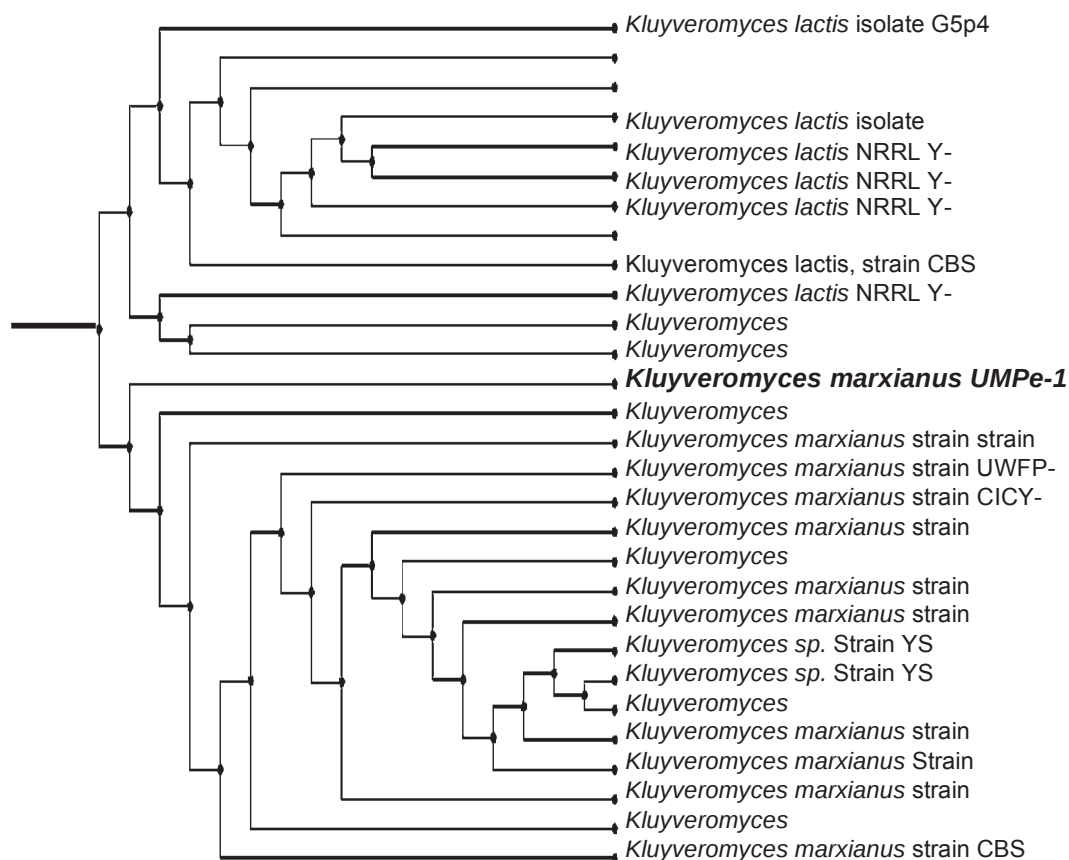


Figura 13. Árbol filogenético de la levadura *Kluyveromyces marxianus*. En negritas se muestra el resultado del análisis del fragmento del aislado Pe1.

Del total de las secuencias analizadas se obtuvieron tres cepas pertenecientes al género *Saccharomyces*, especie *cerevisiae* las cuales fueron los aislados 3 y 9 con un 100% de identidad y el aislado F1 con un 96% de identidad, tres cepas pertenecientes al género *Kluyveromyces* especie *marxianus* las cuales fueron los aislados Pe1 y AM2 con un 99% de identidad y el aislados AM5 con un 95% de identidad, y una sola cepa perteneciente al genero *Hanseniaspora* el cual fue el aislado A2-1 (tabla 9).

Tabla 9. Géneros propuestos para los aislados de acuerdo al análisis de secuencias del RNA_R 26S.

AISLADO	GENERO Y ESPECIE	IDENTIDAD	NOMBRE
3	<i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	100%	UMARN3
9	<i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	100%	UMARN9
A2-1	<i>Hanseniaspora sp .</i>	100%	UMARNA2-1
AM2	<i>Kluyveromyces marxianus.</i>	99%	UMARNAM2
AM5	<i>Kluyveromyces marxianus.</i>	95%	UMARNAM5
F1	<i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	96%	UMARNF1
Pe1	<i>Kluyveromyces marxianus.</i>	99%	UMPe1

4. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LAS CHAPERONAS MOLECULARES SSQ1 Y JAC1

4.1. Selección de autótrofas a uracilo.

En el laboratorio se cuenta con dos plásmidos pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1), los cuales expresan la chaperona molecular SSQ1 y la co-chaperona molecular JAC1, respectivamente. Estos plásmidos cuentan con el gen *ura3* como marcador de selección para auxótrofas a uracilo en levaduras, por lo tanto a partir de la cepa UMPe1 se seleccionaron mutantes en el gen *ura3*. Para la selección de auxótrofas a uracilo (mutantes *ura*-) de la cepa UMPe1, se prepararon cajas con medio YNB-5FOA y uracilo, para seleccionar aquellas mutantes en el gen *ura3*. Del total de cajas espatuladas con cultivo de la cepa UMPe1, solamente se observó la aparición de colonias en la caja petri donde se espatularon 1000 µl de cultivo después de 48 hrs de incubación, de la cual se

obtuvieron 10 colonias, éstas se resembraron en el mismo medio de selección para auxótrofas y después de varios pasos en el mismo medio de selección solamente lograron sobrevivir 4 cepas auxótrofas a uracilo denominadas UMPe1ura⁻, 1, 2, 3, 4, respectivamente (figura 14).



Figura 14. Crecimiento de una de las mutantes UMPe1ura⁻. Fue resembrada en medio YNB, aminoácidos, uracilo, 2% glucosa y 5-FOA, crecida a 30°C durante 24 hrs.

Las cuatro cepas mutantes se caracterizaron por su nivel de tolerancia a etanol comparadas con su cepa parental (UMPe1), con el fin de seleccionar la auxótrofa a uracilo con un comportamiento fenotípico parecido a la cepa parental. Como se muestra en la figura 15 la cepa auxótrofa a uracilo más tolerante fue la cepa denominada UMPe1ura⁻3, presentando una cinética de crecimiento y una tolerancia a etanol similar a su cepa parental. Este resultado sugiere que la mutación del gen ura en esta cepa no afectó el nivel de tolerancia a etanol. Por lo tanto fue seleccionada la auxótrofa UMPe1 ura-3 para ser transformada con los plásmidos pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1).

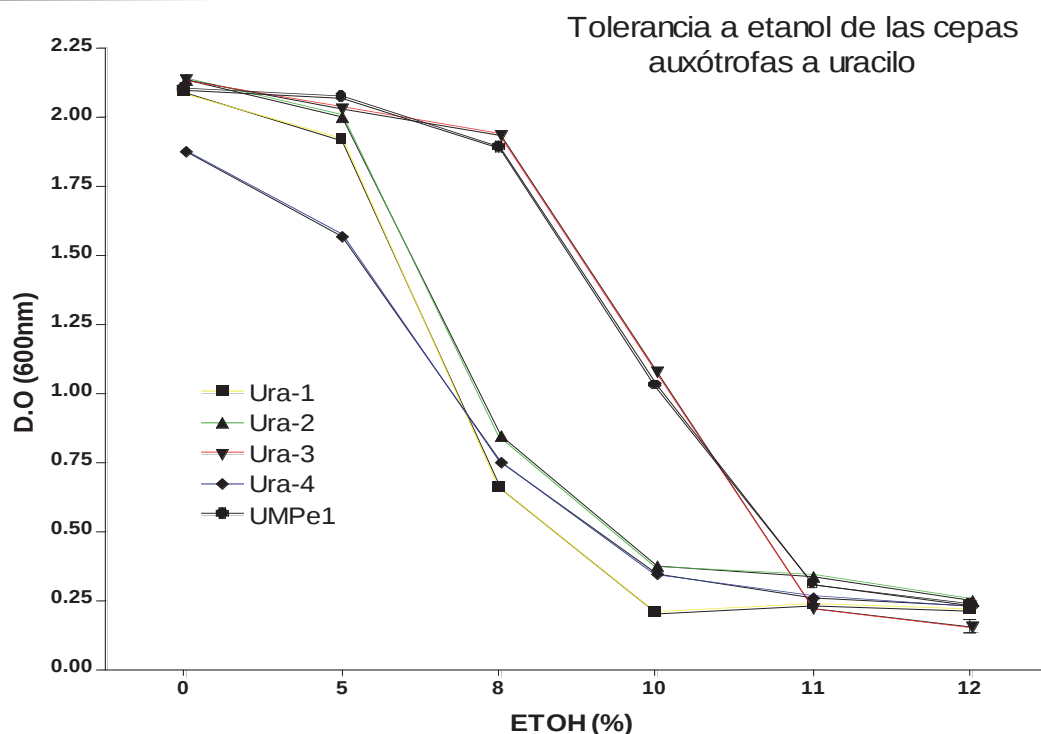


Figura 15. Tolerancia a etanol de las cepas auxótrofas a uracilo (UMPe1Ura 1, 2, 3 y 4) y la cepa silvestre UMPe1. Fue realizada en medio YPD con 2% de glucosa y etanol al 0, 5, 8, 10, 11 y 12%, se incubaron en agitación constante por 18 hrs a 30°C, n=3.

5. Transformación de la cepa auxótrofa a uracilo (UMPe1ura⁻) con los plásmidos pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1).

La mutante UMPe1ura⁻3, fue utilizada para ser transformada con los plásmidos pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1) y evaluar el efecto de la expresión de la chaperona molecular SSQ1 y la co-chaperona molecular JAC1 sobre la tolerancia y producción de etanol. La transformación con el plásmido pYES2(SSQ1), arrojó un total de 4 auxótrofas complementadas, las cuales fueron seleccionadas por complementación en el medio YNB, 2% de glucosa y aminoácidos pero sin sin uracilo, mientras que en el caso de la transformación con el plásmido pYES3(JAC1) se seleccionaron 10 colonias crecidas en el medio de selección para auxótrofas complementadas.

Para confirmar que las transformantes contienen los plásmidos, se realizó la extracción de los plásmidos como se describe en el capítulo 6.4. La presencia de

los plásmidos se verificó en geles de agarosa. El tamaño total del plásmido pYES2(SSQ1) es de 8134 pb y de pYES3(JAC1) de 7189 (Figura 16). El análisis de restricción de los plásmidos obtenidos muestra que dos cepas liberan el fragmento de 1970 pb correspondiente a el gen SSQ1 carril 2 y 3 y sólo una cepa libera el fragmento de 589 pb correspondiente a al gen JAC1, carril 7; confirmando que se encuentran transformadas con los plásmidos mencionados. Mientras en los carriles 4 y 5 no se observó la aparición de plásmido ni del fragmento correspondiente a SSQ1 y en el carril 8 tampoco se observó el fragmento correspondiente a JAC1 por lo que estas cepas fueron descartadas como transformantes (Figura 16).

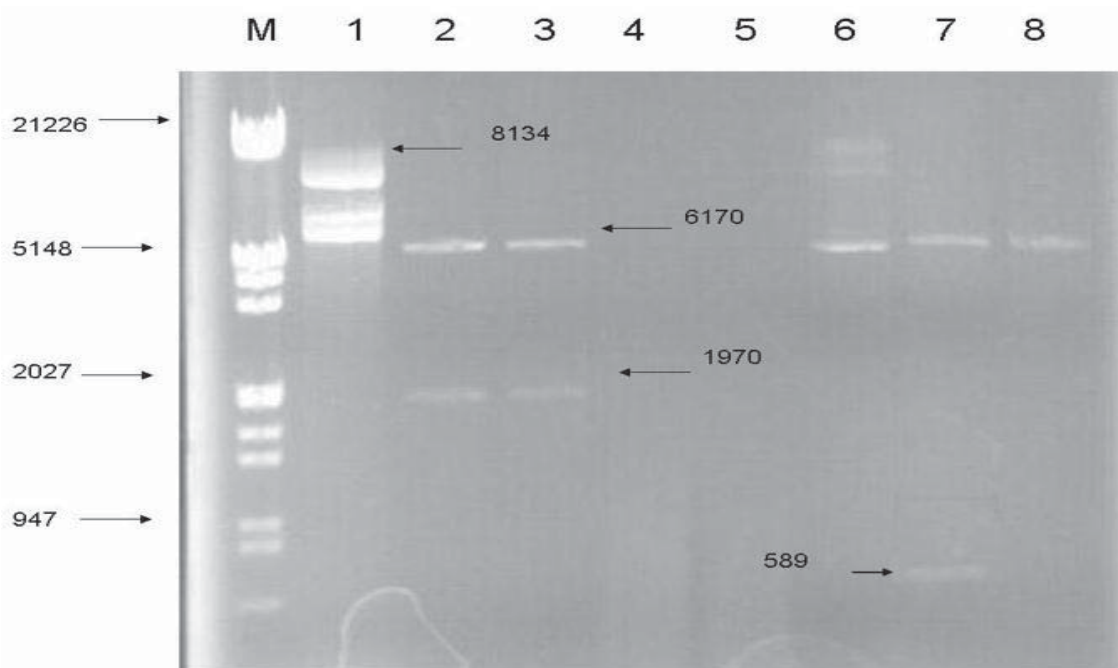


Figura 16. Análisis de restricción de los plásmidos aislados de las transformantes. M= marcador de tamaño molecular, carril 1 plásmido pYES2(SSQ1), carriles 2 y 3 Restricción del plásmido pYES2(SSQ1) procedente de la cepa transformada con las enzimas de restricción XhoI y KpnI. Carril 4 plásmido pYES3(JAC1), carril 5 Restricción del plásmido pYES3(JAC1) procedente de las cepas transformadas, con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI.

6. ANALISIS DE LOS PARAMETROS FERMENTATIVOS DE LAS CEPAS TRANSFORMADAS CON LOS PLASMIDOS pYES2(SSQ1) Y pYES2(JAC1).

6.1. Crecimiento en medio YPD con diferente concentración de glucosa.

Las curvas de crecimiento de las cepas transformadas con pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1) a diferentes concentraciones de glucosa (2, 12 y 16%) mostraron una cinética de crecimiento similar a la cepa silvestre y su parental (Figura 17). El análisis de los resultados obtenidos mostró que las transformantes, la cepa silvestre y su parental tuvieron una velocidad de crecimiento similar obteniendo un tiempo de duplicación de 3 hrs a concentraciones de glucosa del 2 y 12%. Por otro lado, a concentraciones del 16% de glucosa la cepa auxótrofa a uracilo mostró un tiempo de duplicación de 4 hrs. A su vez, las transformantes y la silvestre tuvieron la mayor población mostrando una velocidad de crecimiento mayor comparadas con la cepa auxótrofa a esta concentración de glucosa (Tabla 10).

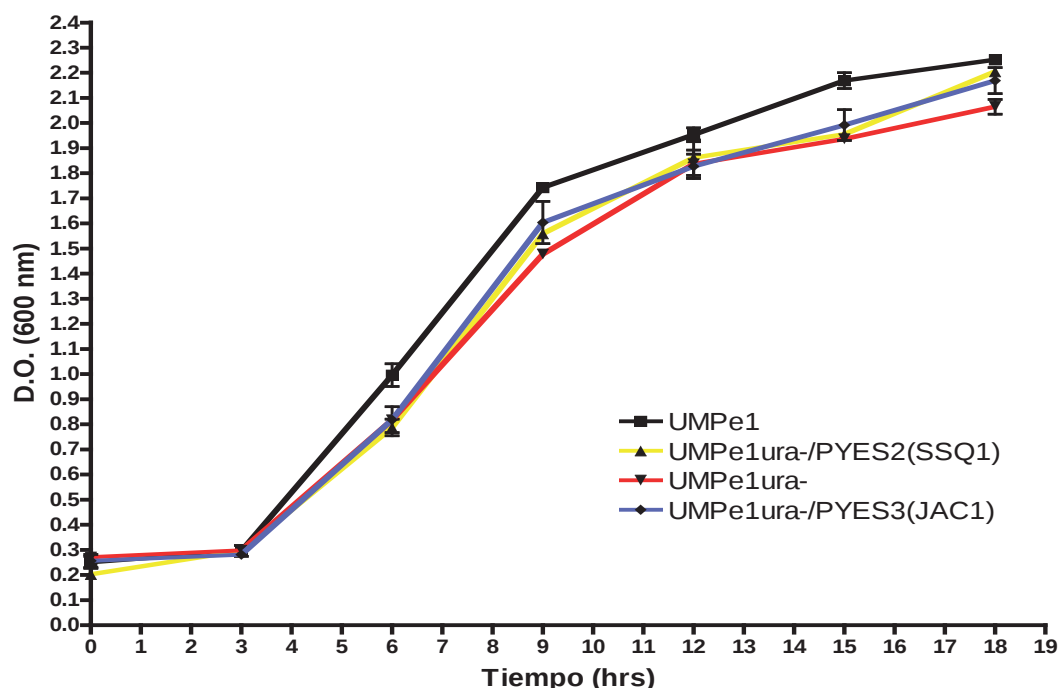


Figura 17. Curva de crecimiento de las cepas UMPe1, UMPe1ura-3, UMPe1ura-/PYES2(SSQ1) y UMPe1ura-/PYES3(JAC1) en YPD con glucosa (16%). Se incubaron en a 30°C, n=3.

Tabla 10. Análisis de los parámetros de crecimiento en medio YPD de las cepas UMPe1, UMPe1ura-3, UMPe1ura-/PYES2(SSQ1) y UMPe1ura-/PYES2(JAC1) con diferentes concentraciones de glucosa.

	Glucosa (2%)			Glucosa (12%)			Glucosa (16%)		
Aislado	Pob (X10 ⁶)	$\mu_{\max}$ (hr ⁻¹)	Td (hr)	Pob (X10 ⁶)	$\mu_{\max}$ (hr ⁻¹)	Td (hr)	Pob (X10 ⁶)	$\mu_{\max}$ (hr ⁻¹)	Td (hr)
UMPe1	133	0.22	3.1	141	0.22	3.1	140	0.23	3
UMPe1ura-	130	0.21	3.3	123	0.21	3.3	125	0.17	4
UMPe1ura- /pYES2(SSQ1)	140	0.21	3.3	137	0.21	3.3	143	0.20	3.4
UMPe1ura- /pYES3(JAC1)	138	0.21	3.3	130	0.21	3.3	140	0.19	3.2

Pob = Población (celulas/ml), $\mu_{\max}$ = Velocidad máxima de crecimiento (hr⁻¹), Td = Tiempo de duplicación (hrs)

6.2. Tolerancia a etanol.

Se observó que la cepa auxótrofa, la cepa silvestre UMPe1 y la auxótrofa complementada con el plásmido pYES3(JAC1) tuvieron el menor nivel de tolerancia a etanol; las cuales a partir del 10% de etanol (v/v) mostraron una disminución en el crecimiento celular, mientras que la cepa auxótrofa transformada con el plásmido pYES2(SSQ1) presentó el mayor nivel de tolerancia a etanol, mostrando una disminución de su crecimiento hasta una concentración de etanol del 11% (v/v) (Figura 18).

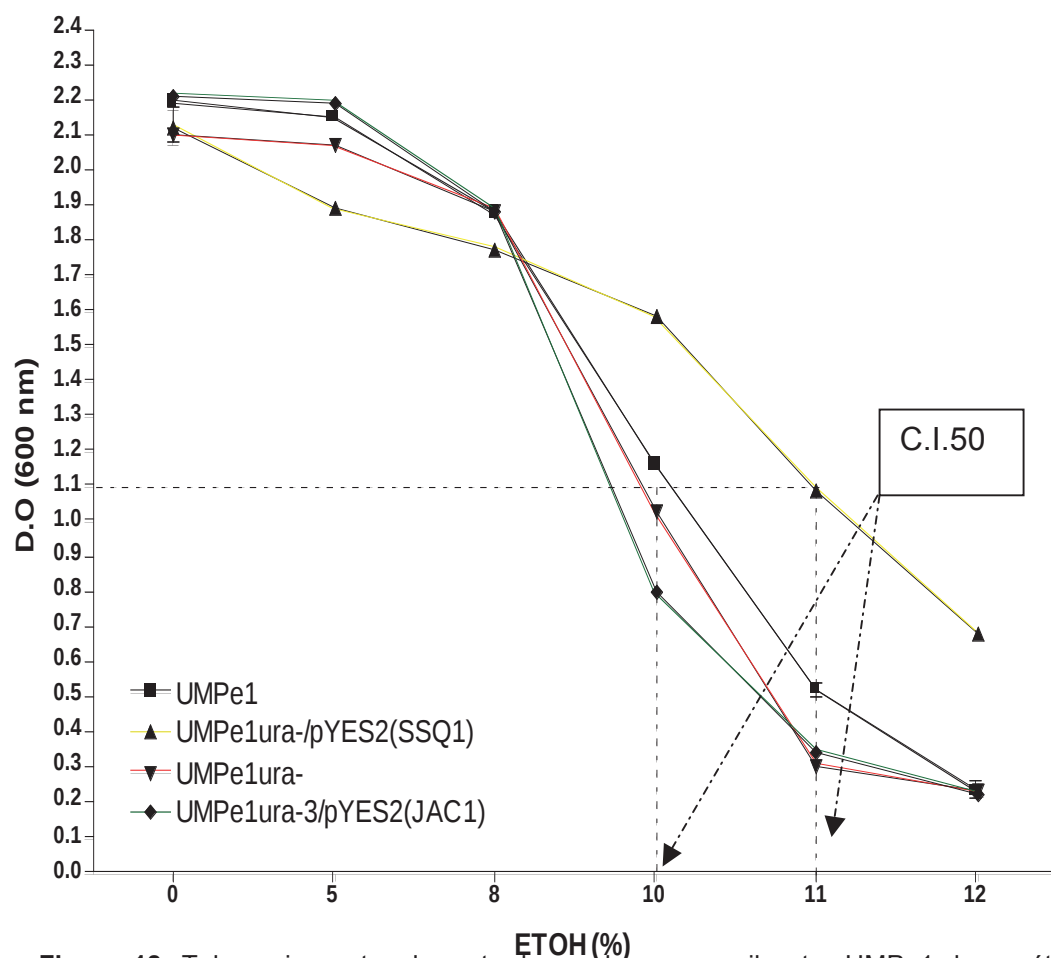


Figura 18. Tolerancia a etanol mostrada por las cepas silvestre UMPe1, la auxótrofa a uracilo UMPe1ura- y las cepas transformantes UMPe1ura-/pYES2 (SSQ1) y UMPe1ura-/pYES3 (JAC1), en medio líquido YPD con 2% de Glucosa y diferentes concentraciones de etanol, n=3.

Con la curva obtenida del ensayo de tolerancia a etanol se realizó la medición de la concentración inhibitoria 50, donde se encontró que la cepa auxótrofa y la transformante pYES3(JAC1), fueron las más afectadas ya que mostraron una C.I 50 a una concentración de etanol del 9.8% (v/v), mientras que la cepa silvestre mostró una C.I. 50 a una concentración de etanol del 10% (v/v) y la cepa más tolerante fue la auxótrofa complementada pYES2(SSQ1) ya que logró tolerar una concentración del 11% (v/v), concentración a la cual se inhibió el crecimiento celular al 50%. Con esto podemos sugerir que la expresión de la chaperona molecular SSQ1 incremento el nivel de tolerancia de la cepa UMPe1ura-/pYES2(SSQ1) (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración inhibitoria 50 a etanol en las cepas transformadas.

CEPA	C.I. 50 a etanol (%)	% Diferencia de tolerancia
UMPe1	10.0	0
UMPe1 ura-	9.8	-2
UMPe1 ura- / pYES2(SSQ1)	11.0	10
UMPe1 ura- / pYES3(JAC1)	9.8	-2

Crecidas a 30 °C con agitación constante, donde C.I 50 (concentración inhibitoria 50), n=3

6.3. Obtención de la dosis letal 50 (D.L.50).

Las levaduras se crecieron en medio líquido YPD con glucosa al 2%, 12 hrs antes de ser inoculado el medio líquido con las diferentes concentraciones de etanol (9 al 12%) a probar. Después de 3 hrs de inoculación con las diferentes concentraciones de etanol, se encontró que la levadura UMPe1ura⁻/pYES2(SSQ1), presentó la D.L. 50 más alta la cual fue a una concentración de etanol del 12% (v/v); mientras que el resto de las cepas analizadas mostraron una D.L. 50 a una concentración de etanol del 11% (v/v) (Figura 19). Esto demuestra que la transformación de la cepa con el plásmido pYES2(SSQ1) confirió un 10% de mayor tolerancia que la silvestre y un 12% más tolerante que su parental y la transformante pYES3(JAC1) (Tabla 12).

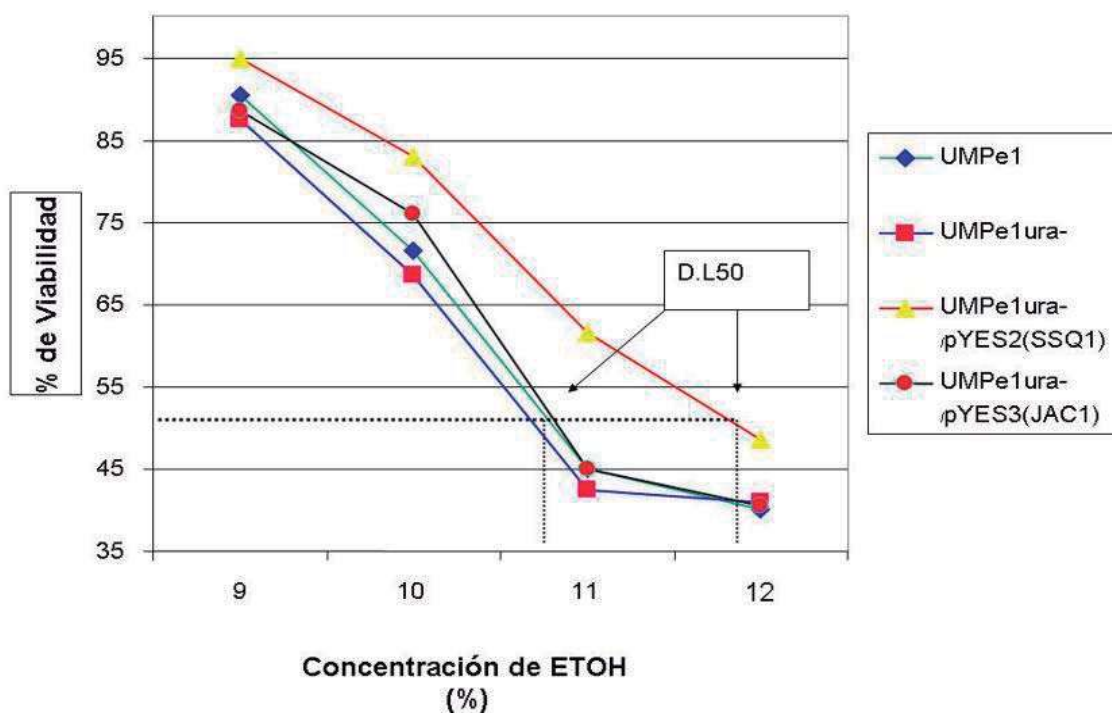


Figura 19. Curva de viabilidad a diferentes concentraciones de etanol (9, 10, 11, 12%), la adición de las concentraciones de etanol se realizó en un cultivo de 12 hrs de crecimiento, después de 3 hrs se realizó un conteo de viabilidad celular, n=3

Tabla 12. Dosis letal 50 de las cepas transformantes.

CEPA	D.L 50 a etanol (%)	Diferencia en la tolerancia (%)
UMPe1	11.0	0
UMPe1 ura-	10.8	-2
UMPe1 ura- / pYES2(SSQ1)	12.0	10
UMPe1 ura- / pYES3(JAC1)	10.8	-2

La determinación se realizó después de 3 hrs de adición del etanol a la concentración indicada (Figura 19)

6.4 Viabilidad celular al 11% de etanol.

El ensayo se realizó en medio líquido YPD con glucosa al 2%, los cultivos se crecieron por 12 hrs y posterior se les agregó la cantidad de etanol necesaria para tener una concentración final del 11% (v/v) de etanol en el medio. Al inicio de ensayo cuando se agrego el etanol se tenía una viabilidad celular del 90% en todos los cultivos, los cuáles se incubaron a 30°C, realizandó muestreos cada 3 hrs. Se observó una disminución cercana al 50% en la viabilidad celular después de 6 hrs de exposición al etanol en las cepas silvestre, auxótrofa a uracilo y en la transformada con el plásmido (JAC1), mientras que en el caso de la cepa transformada con el plásmido (SSQ1) se observó una disminución menor de su viabilidad celular con respecto al tiempo comparada con las otras cepas (Figura 20).

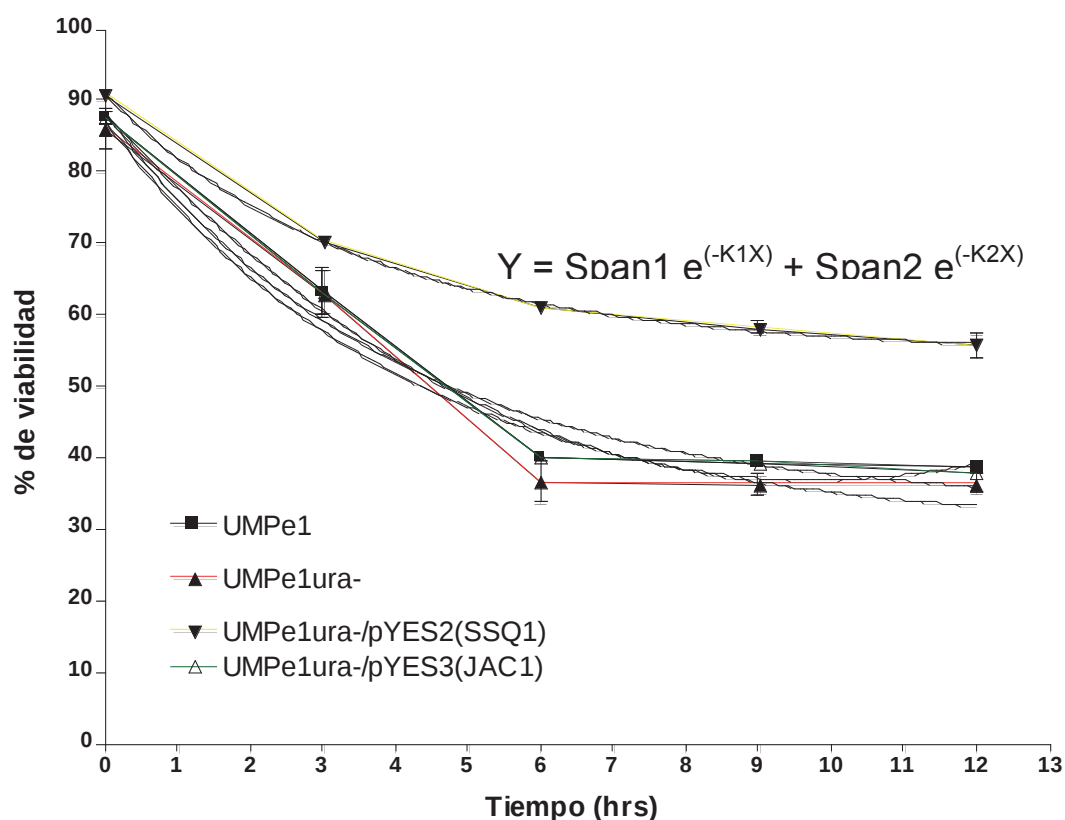


Figura 20. Curva de viabilidad en presencia de etanol al 11% (v/v), de las cepas UMPe1, UMPe1ura- y las cepas transformantes UMPe1ura- pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1). El ensayo se realizó en medio líquido YPD con 2% de glucosa. Incubando a 30°C con agitación constante. n=3.

La cepa transformada con el plásmido pYES2(SSQ1) logró mantener un 55.7% de sus células viables, un 50% más comparada con el resto de las levaduras analizadas (Tabla 13). Se encontró una constante de muerte celular para la transformante con el plásmido pYES2(SSQ1) de 0.84 mientras que el resto de las levaduras mostraron una constante de 1.6, indicando que la muerte celular de la auxótrofa complementada SSQ1 mostró una relación de 2:1 con respecto de las otras levaduras (Figura 20 y Tabla 13).

Tabla 13. Resultados obtenidos del análisis de viabilidad donde se representa la constante de muerte celular obtenida de las pendientes mostradas en la figura 20.

Cepas	Población inicial (X10 ⁶)	Población viable 12hrs (X10 ⁶)	Células Viables (%)	Diferencia de viabilidad (%)	Constante de muerte celular (K)
UMPe1	200	77.4	38.7	0	1.60
UMPe1 ura-	200	73	36.5	-6	1.53
UMPe1 ura-/ pYES2 (SSQ1)	200	111.4	55.7	44	0.84
UMPe1 ura-/ pYES3 (JAC1)	200	77	38	0	1.60

7. PRODUCCION DE ETANOL EN LA FERMENTACIÓN DE JUGO DE AGAVE A 16 °Brix ADICIONADO CON SULFATO DE AMONIO.

El análisis de la fermentación y del consumo de azúcares, mostró que el primer azúcar consumido por las cepas es la glucosa, la cual se especula es utilizada para el desarrollo celular ya que alcanzaron una concentración de biomasa y una velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) similar, teniendo un tiempo de duplicación promedio de 2.5 hrs (Figura 21; Tabla 14). En el caso de la producción de etanol se encontró que la cepa UMPe1ura-/pYES2(SSQ1) alcanzó la mayor producción la cual fue de un 11.45% (v/v) (9.04 g/l), logrando una eficiencia con respecto al rendimiento teórico del 110.7%; mientras que la cepa silvestre obtuvo una producción de etanol del 9.9% (v/v) (8.07 g/l) y con una

eficiencia del 95.7%; la cepa auxótrofa a uracilo mostró una producción de etanol del 9.4% (v/v) (7.41 g/l) con una eficiencia del 90.3%; la cepa comercial logró producir un 8% (v/v) (6.31 g/l) con una eficiencia del 77.3% y la cepa UMPe1ura-/pYES3(JAC1) logró producir un 9.3% (v/v) de etanol (7.4 gr/l) con una eficiencia del 90.3% (Tabla 14) . De estos resultados se determinó como la cepa menos eficiente a la comercial de panadería y como la cepa más eficiente a la transformada con el plásmido pYES2(SSQ1), ya que mostró la mayor producción de etanol siendo un 15% más eficiente que la silvestre, un 20% más eficiente que la auxótrofa a uracilo y la transformada con el plásmido pYES3(JAC1) y un 30% más que la de panadería.

De este resultado podemos concluir que la expresión de la chaperona molecular SSQ1 aumento la tolerancia por lo que esta cepa fue la mayor productora de etanol al ser más tolerante comparada con el resto de las levaduras, mientras que la co-chaperona molecular no logró aumentar ni la tolerancia ni la producción de etanol siendo el comportamiento similar a la cepa silvestre.

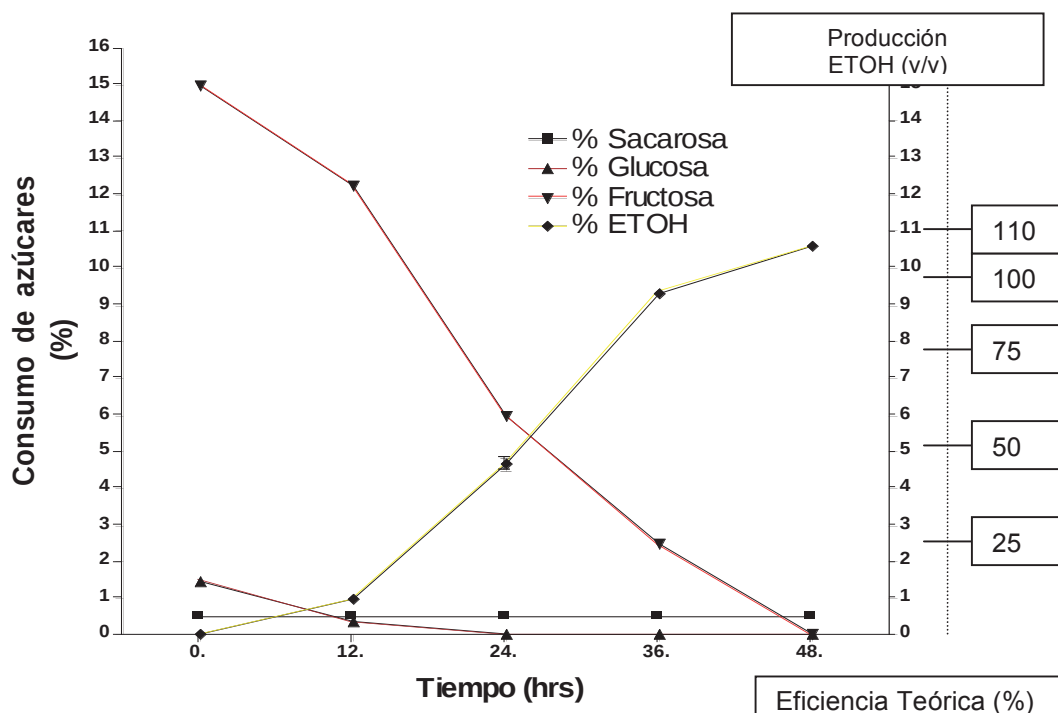


Figura 21. Producción de etanol por la cepa UMPe1ura-/pYES2(SSQ1) en jugo de agave a 16°Brix, a 30°C con agitación constante, n=3.

Tabla 14. Análisis de los parámetros de la fermentación de la cepa UMPe1ura-/pYES2(SSQ1) en jugo de Agave a 16 °Brix suplementado con sulfato de amonio .

Cepa	Azúcares (g/l)	Biomasa (g/l)	Td (hr)	(%) Etanol producido	Etanol Producido (g/l)	(%) Eficiencia Ys/p	Diferencia (%) en la Eficiencia
UMPe1	160	23.2	2.6	9.9	7.81	95.7	0
UMPe1 ura-	160	22.04	2.8	9.4	7.41	90.3	-5
UMPe1 ura- /pYES3(JAC1)	160	23.2	2.6	9.3	7.4	90.3	-5
UMPe1 ura- /pYES2(SSQ1)	160	22.6	2.8	11.45	9.03	110.7	15.6
Panadería	160	21.9	2.87	8	6.31	77.3	-18.7

Td = tiempo de duplicación, eficiencia calculada en base a la concentración de azúcares totales con respecto a la producción de etanol (Ys/p) n=3

VIII. DISCUSION

La finalidad de nuestro trabajo fue evaluar el efecto de la chaperona molecular SSQ1 y la co-chaperona molecular JAC1, sobre el nivel de tolerancia a etanol y si éstas chaperonas tienen algún efecto sobre la producción de etanol en levaduras. Como se mencionó en los antecedentes el efecto de la chaperona molecular y co-chaperona molecular fue evaluado por Campos-García y col; en el 2000. Villagomez-Zavala en el 2002, Nuñez-Pastrana en el 2004 y Reséndis-Tamayo en el 2007, los cuales analizaron este efecto en bacterias como *P. aeruginosa* y *E. coli*. En cepas etanologénicas observaron un aumento en la tolerancia y producción de etanol. Por lo que el primer paso fue obtener levaduras aislada del jugo de Agave con potencial utilización en la elaboración de bebidas alcohólicas, para lo cual se utilizó jugo de Agave obtenido de varias tequileras ya que se buscaron las levaduras con características de productoras de etanol siendo tanto las tequileras el hábitat natural de este tipo de microorganismos, así mismo se realizaron aislamientos de vinazas de las destilerías.

Con el jugo de Agave se realizaron fermentaciones espontáneas con diferentes concentraciones de azúcares y con diferentes concentraciones de etanol (Tabla 3), a las cuales sólo se le agregó como fuente de nitrógeno, fosfato de amonio, el cual favorece el incremento en el número de células de levadura, así como para inducir el transporte de azúcares al interior de la célula para ser transformados en etanol (Jacques y col, 2003). Con las vinazas se realizaron diluciones las cuales se sembraron en cajas de petri en medio YPD con glucosa al 2%, medio rico para el crecimiento de levaduras.

Lachance en 1995 encontró 10 géneros diferentes de levaduras presentes en la fermentación de jugo de Agave. En este trabajo se aislaron 89 levaduriformes obtenidos de las fermentaciones realizadas, por lo que con esa cantidad de aislados aseguraríamos tener alguno de los géneros descritos por Lachance, los cuales son productores de etanol. Para la selección de los

levaduriformes aislados que sean productores de etanol. Estos se crecieron en medio YPD con glucosa al 2% con la adición de pararosinalina y bisulfito de sodio, ya que la mezcla de pararosinalina y bisulfito de sodio en el medio es utilizado para detectar aldehídos los cuales son indicativos de la presencia de etanol por aquellos microorganismos productores de etanol (Conway y col., 1987). Con los levaduriformes seleccionados como productores de etanol (3, AM2, AM5, y Pe1) y los controles (cepa de panadería y cepa de vinos "9"), se realizó la caracterización de cada uno por su velocidad de crecimiento, osmotolerancia, tolerancia al etanol y producción de etanol por fermentación en jugo de Agave a 16 °brix, esterilizado y adición de diferentes fuentes de nitrógeno. Encontrando que la fuente de nitrógeno que favoreció la fermentación fue el sulfato de amonio similares resultados se han reportado con sulfato de amonio como la fuente de utilizada en los procesos de fermentación alcohólica (Téllez y Arrizon; 2001).

De los ensayos anteriores se seleccionó como el mejor aislado al denominado Pe1, ya que mostró las velocidades de crecimiento mayores a diferentes concentraciones de glucosa con un menor tiempo de duplicación y alcanzando la fase estacionaria una hora antes de la reportada para *S. cerevisiae* (Gschaedler y col; 2000), (Figura 6, Tabla 4). Además fue el aislado más osmotolerante mostrando tener el mayor número de células por mililitro comparado con *S. cerevisiae* (Arrizon, 2001) (Figura 7, Tabla 5) y por ser el más tolerante al etanol logrando tolerar hasta un 10% (v/v), y una concentración inhibitoria 50 a la concentración de etanol del 10% (Figura 8, Tabla 6), comparado con las levaduras aisladas y las utilizadas como control (Panadería y "9") ya que se ha reportado que la tolerancia del etanol en levaduras se encuentra entre el 5 y 7% (v/v) (Ingram y col., 1989).

Además de ser el mejor aislado bajo los parámetros fermentativos mencionados anteriormente también fue el que mostró mayor producción de etanol con las diferentes fuentes de nitrógeno usadas logrando la máxima

concentración de etanol 9.2% cuando se utilizó sulfato de amonio y una concentración de azúcares de 16 °Brix, teniendo el mayor rendimiento en la producción (84%) con respecto del rendimiento teórico. El análisis indicó que se obtuvo un 14% más en producción de etanol que la cepa comercial y la cepa de vinos "9", además de presentar un rendimiento y una producción mayor que la reportada por otros microorganismos utilizados en fermentaciones alcohólicas, la cual está en el rango de un 5 a 7% (v/v) representando un 80% de rendimiento con una concentración de azúcares de 12 a 16 °Brix. Cabe mencionar que la mayoría de cepas utilizadas para la fermentación alcohólica no llegan a tolerar concentraciones mayores de 15 °Brix siendo una limitante para la industria ya que se alargan los tiempos de fermentación y por consiguiente trae una disminución en los rendimientos de producción (Rodríguez y col., 1999; Pinal y col., 2003).

El resultado obtenido de estos ensayos se puede explicar, ya que el aislado más osmotolerante, tolerante a etanol y el mejor productor de etanol fue el denominado Pe1, aislado de las vinazas de destilería donde se encontraba en un ambiente con concentraciones altas tanto de azúcares y etanol y por consiguiente al estar en ese tipo de ambientes sufrió una serie de adaptaciones a ese tipo de condiciones lo que generó una cepa más resistente. Para la realización de los siguientes ensayos se seleccionó al aislado denominado Pe1.

El siguiente paso fue el conocer el género y la especie del aislado Pe1 para determinar las herramientas genéticas a utilizar para probar el efecto de la chaperona molecular SSQ1 y la co-chaperona molecular JAC1 en tolerancia y producción de etanol.

De este ensayo se encontró después de un análisis tipo blast, y de la construcción de un dendograma y árbol filogenético (Figuras 12 y 13), que el aislado Pe1 pertenece al género *Kluyveromyces marxianus*, uno de los géneros de levadura antes descrito por Lachance en 1995, como una levadura presente en la fermentación alcohólica, aunque en la actualidad no se utiliza de manera cotidiana

en la producción de etanol ya que el tipo de levadura utilizado en las industrias alcoholeras es *Saccharomyces cerevisiae*, la cual ha sido adaptada a los distintos medio de fermentación utilizados (Gschaedler, 2004). Al conocer que esta levadura no ha sido reportada se decidió denominarla como UMPe1 (Tabla 9).

Para medir el efecto de la expresión de las chaperona moleculares SSQ1 y JAC1, se contó con dos plásmidos denominados pYES2(SSQ1) y pYES3(JAC1), los cuales tienen como marcador de selección en levaduras (gen *ura3*), por lo que se decidió obtener mutantes auxótrofos a uracilo de la levadura UMPe1. La levadura UMPe1 fue sometida a un ensayo de selección por presión selectiva para obtener auxótrofos a uracilo. Para lograr esta selección de auxótrofos a uracilo denominadas mutantes *ura⁻* se utilizo el ácido 5-fluororótico (5-FOA) descrito por Boeke y col; en 1984, el cual es utilizado por las levaduras que contienen la descarboxilasa orotidin 5'-fosfato (gen *ura3*) transformándolo en 5-fluoroacil, producto tóxico para ellas, y que nos permitió seleccionar aquellas que fuesen *ura⁻* (auxótrofos a uracilo).

Se obtuvieron 4 auxótrofos a uracilo de la levadura UMPe1 denominadas UMPe1*ura⁻* 1, 2, 3, y 4 (figura 14); a las cuales se les midió su nivel de tolerancia a etanol para descartar que las mutantes pudieran estar afectadas en el fenotipo de tolerancia con respecto a su parental, del ensayo se obtuvo que solamente una de las mutantes (UMPe1*ura*-3) mostró el fenotipo silvestre indicando que no fue afectado su nivel de tolerancia, esta perdida del fenotipo podría indicar que además de ser afectadas en el gen *ura3* pudieron haber sido dañadas en algún otro gen que contrarrestara el efecto tóxico del etanol haciéndolas más sensibles y por consiguiente menos tolerantes al etanol. No se descarta que la levadura UMPe1*ura*-3, aunque mostró tener un fenotipo similar a la cepa parental en tolerancia al etanol pudiera estar afectada en otro de sus genes, los cuales a diferencia de las otras mutantes no afectaron su nivel de tolerancia (Figura15). De este resultado se seleccionó a la levadura UMPe1*ura*-3 para ser transformada con

los plásmidos y medir el efecto de las chaperonas moleculares sobre la tolerancia y producción de etanol.

De la transformación se obtuvieron un total de cuatro auxótrofas complementadas con el plásmido pYES2(SSQ1) y diez con el plásmido pYES3(JAC1), éstas mutantes complementadas se seleccionaron en ausencia de uracilo (crecimiento en medio mínimo YNB sin uracilo) (Figura 14), y a cada transformante se le realizó el aislamiento de plásmido y un análisis de restricción utilizando la metodología descrita por Fink y col; en el 2005; obteniendo solo en dos de las transformantes para el caso de la transformada con el plásmido pYES2(SSQ1) un fragmento de 1970 pb perteneciente al gen que codifica la chaperona molecular SSQ1, y para el plásmido pYES3(JAC1) un fragmento de 589 pb codificando a la co-chaperona molecular JAC1 en una sola cepa transformada, confirmando de esta manera la presencia del plásmido correspondiente (Figura 16).

Las cepas auxótrofas complementadas UMPe1ura⁺/pYES2(SSQ1), UMPe1ura⁺/pYES3(JAC1), la auxótrofa a uracilo UMPe1ura⁻ y la silvestre UMPe1 se utilizaron en un ensayo para determinar su velocidad de crecimiento en medio YPD con diferentes concentraciones de glucosa, donde se observó que las cepas tuvieron un tiempo de duplicación promedio de 3 horas a concentraciones de 2, 12 y 16% de glucosa y una velocidad de crecimiento muy similar en las cuatro cepas probadas, lo que nos sugiere que las cepas auxótrofas complementadas y la auxótrofa a uracilo no fueron afectadas en su crecimiento por el aumento en las concentraciones de glucosa presentes, presentando el mismo fenotipo que la cepa parental (Figura 17, Tabla 10).

Para conocer el efecto de la expresión la chaperona molecular SSQ1 y la co-chaperona molecular JAC1 sobre la tolerancia a etanol de las cepas (silvestre, auxótrofa y auxótrofas complementadas), se realizó un ensayo de tolerancia a diferentes concentraciones de este metabolito. Encontrando que la transformación

no afectó el nivel de tolerancia ya que la levadura auxótrofa a uracilo y la auxótrofa complementada con el plásmido pYES3(JAC1), mostraron una tolerancia similar a la cepa parental, mientras que la levadura más tolerante a etanol fue la cepa transformada con el plásmido pYES2(SSQ1) (Figura 18).

De este ensayo se calculó la concentración inhibitoria 50 (C.I.50), concentración a la cual se obtiene el 50% de crecimiento respecto a un cultivo sin etanol, presentando la cepa mutante transformada con el plásmido que expresa la chaperona molecular SSQ1, una C.I.50 a una concentración de etanol del 11%, un 10% más tolerante que la cepa silvestre y un 12% más tolerante que la cepa transformante con el plásmido pYES3(JAC1) y su parental. Estos resultados sugieren que la expresión de la chaperona molecular SSQ1 contribuye en la disminución de los efectos tóxicos ocasionados por el etanol permitiendo el desarrollo celular de la levadura a altas concentraciones de éste (Figura 18, Tabla 11).

Adicionalmente se determinó la D.L. 50, concentración de etanol a la cual las levaduras conservan la mitad de su población viable. Se encontró que después de 3 hrs de inoculación con las diferentes concentraciones de etanol, la levadura que expresa la chaperona molecular SSQ1, presentó la D.L.50 mayor la cual fue a una concentración de etanol del 12% mientras que el resto de las levaduras analizadas mostraron una D.L.50 a una concentración del 11% de etanol, indicando que la transformada con el plásmido pYES2(SSQ1), es un 10% más tolerante al etanol que la auxótrofa a uracilo, la silvestre y la transformante con el plásmido pYES3(JAC1), por lo tanto de este ensayo se concluye que la tolerancia es mejorada por la acción de la chaperona molecular SSQ1, la cual puede tener un efecto de protección sobre proteínas inactivadas por el etanol, permitiendo que éstas puedan conservar su función cuando están expuestas al etanol (Figura 19, Tabla 12).

Utilizando las pendientes de las curvas obtenidas del ensayo anterior se determinó la constante de muerte celular de cada levadura siendo la levadura

transformada con el plásmido pYES2(SSQ1) la que mostró la constante de muerte menor (0.84), mientras que el resto de las cepas mostraron una constante de muerte celular de 1.6, representando que la levadura transformada con SSQ1 pierde su población más lentamente con respecto de las otras tres en una relación de 1 a 2. Por lo tanto con este dato y los obtenidos de los ensayos de tolerancia podemos confirmar que la expresión de la chaperona molecular SSQ1 participa directamente en la protección contra los efectos tóxicos ocasionados por el etanol, disminuyendo la velocidad de la muerte celular hasta en un 50% con respecto a las cepas silvestres (Figura 20, Tabla 13).

Después de determinar que la chaperona molecular SSQ1 participa en la tolerancia al etanol se realizó un ensayo de producción de etanol por fermentación en jugo de Agave, para determinar la participación de las chaperonas moleculares SSQ1 y la co-chaperona molecular JAC1 en la producción de alcohol. El ensayo de fermentación se realizó en jugo de Agave a 16°brix suplementado con sulfato de amonio.

De este experimento se encontró que la levadura transformada con el plásmido pYES2(SSQ1), fue la que presentó mayor producción de etanol, alcanzando una producción del 11.45%, con una eficiencia del 110%, significando un 15% más con respecto de la cepa silvestre, adicionalmente mostró un 20% de mayor producción que la auxótrofa a uracilo y la levadura transformada con JAC1 y hasta un 30% más que la cepa de panificación comúnmente usada en la industria para fermentación alcohólica, de este análisis al determinar la producción de etanol y el rendimiento obtenido por la cepa transformante SSQ1 se encontró una eficiencia del 110.7% un 10.7% mayor del teórico, esto se podría explicar solamente si el microorganismo cambio su ruta metabólica o utilizó algunos subproductos que generaron un aumento en la producción de etanol.

Con los resultados de tolerancia podemos suponer que cuando un microorganismo es capaz de tolerar mayores concentraciones de etanol es

probable que se incremente el nivel de producción de etanol (Osman e Ingram, 1985), en este respecto la protección otorgada al microorganismo por parte de la chaperona molecular SSQ1 le permitió tener una mayor tolerancia y producción de etanol, ya que se ha descrito que el etanol producido por los mismos microorganismos fermentadores como las levaduras llega a ocasionar una disminución del crecimiento, ya que se ha descrito que el mecanismo de inhibición del crecimiento y de la fermentación es ocasionado por retroalimentación o por inactivación de enzimas involucradas en la fermentación, lo que conllevaría a una disminución en la producción de etanol (Yehia y col., 1985). Por lo tanto podemos concluir que la protección de la chaperona molecular SSQ1 sobre los efectos tóxicos del etanol en la levadura transformada con el plásmido pYES2(SSQ1) le permitió tener una tolerancia mayor al etanol y por consiguiente podemos mencionar que también esta involucrada en la producción de etanol en levaduras bajo condiciones de fermentación.

Estos ensayos realizados con las levaduras transformadas mostraron que la chaperona molecular SSQ1, participa directamente en la tolerancia al etanol permitiendo tener una mayor producción de este metabolito en procesos de fermentación, siendo la ADHII una de las enzimas más importantes en la ruta de síntesis del etanol (Fermentación). Esta enzima se sabe es activada por hierro (Fe), pero no se tiene conocimiento del mecanismo por el cual es ensamblada, ni si requiere Fe o grupos Fe-S (Reséndiz-Tamayo y col., 2007), y como se ha reportado que la chaperona molecular SSQ1 esta involucrada en procesos de ensamblaje de centros Fe-S, es posible que la enzima blanco de la chaperona SSQ1, en la protección o en el ensamblaje sea la ADHII, por lo cual se pudieran explicar la alta producción de etanol producida por la transformante que expresa la chaperona molecular SSQ1.

IX. RESUMEN DE RESULTADOS

- Se seleccionaron 6 cepas de levadura como las mejores productoras de etanol.
- Las cepas silvestres tuvieron una tolerancia a una concentración promedio del 9% (v/v) de etanol.
- La mayor producción de etanol se obtuvo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.
- Las cepas silvestres alcanzaron una eficiencia de producción de etanol de un 95% en promedio con respecto del rendimiento teórico.
- Se lograron identificar tres levaduras pertenecientes al género de *Saccharomyces cerevisiae* y tres a *Kleuveromyces marxianus* como las mejores productoras de etanol.
- La tolerancia a etanol de la cepa transformante UMPe1ura-/pYES2(SSQ1) aumentó en un 10% respecto a la cepa silvestre y la transformante UMPe1ura-/pYES3(JAC1).
- La producción de etanol de la cepa transformante con el plásmido pYES2(SSQ1) fue 15% mayor que la cepa silvestre, 20% mayor que su parental y un 19% mayor a la cepa de panadería.

X. CONCLUSIONES

- Con el conjunto de resultados obtenidos de los diferentes ensayos realizados se puede concluir que la cepa *Kluyveromyces. marxianus*, transformada con el plásmido pYES2(SSQ1) el cual expresa la chaperona molecular SSQ1, toleró concentraciones de etanol del 12% (v/v), produciendo la mayor cantidad de etanol 11.45% (v/v) en la fermentación de jugo de Agave a 16 °Brix.
- Por lo tanto podemos concluir que la chaperona molecular SSQ1 esta involucrada en la tolerancia y producción de etanol en la levadura de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1ura-.

XI. BIBLIOGRAFIA

Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. **2002** "The cell", Garland science.

Arrizon, J. **2001**. "Efecto de la concentración de azúcar y la adición de nitrógeno sobre el proceso de fermentación del tequila" Tesis de maestría en ciencias en procesos biotecnológicos de la universidad de Guadalajara.

Barbosa, M.F., Yomano, L.P. and Ingram, L.O. **1994**. Cloning, sequencing and expression of stress genes from the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis*: the *groESL* operon. Gene 148:51-57.

Barnett, J. A. **1981** "the utilization of disaccharides and some other sugars by yeast", Adv. Carb. Chem. Biochem, 39 347-344.

Blaszczak, A., Zylics, M., Georgopoulos, C. and Liberek, K. **1999**. Both ambient temperature and the DnaK chaperone machine modulate the heat shock response in *Escherichia coli* by regulating the switch between σ^{70} and σ^{32} factors assembled with RNA polymerase. EMBO J. 20:5085-5093.

Birthe, F*, Saude r, U. y Aebi, U. **2004** "The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis" Journal of Cell Science 117, 115-126.

Boeke, J. D., LaCrute, F. y Fink, G. R. **1984** "Mutants *ura3*" Molecular gen. Genet 197, 345.

Boles, E. y Hollenberg, C. P. **1997** " The molecular genetics of hexose transport in yeast", FEMS microbiol. Rev. 21 85-111.

Brinker, A., Pfeifer, G. 2001. "Dual function of protein confinement in chaperonin-assisted protein folding." *Cell* 107(2): 223-33.

Cabral M.G., Viegas C.A., Sa-Correia I. 2002 “**Mechanisms underlying the acquisition of resistance to octanoic-acid-induced-death following exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to mild stress imposed by octanoic acid or ethanol**”

Campos-García, J., Ordoñez, G.L. and Soberón-Chavez, G. 2000. The *Pseudomonas aeruginosa hscA* gene encodes Hsc66, a DnaK homologue. *Microbiology*. 146:1429-1435.

Conway, T., Sewell, G. W., Osman, A., Ingram, O. 1987 “Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*”. *Journal of bacteriology* 169: 2591-2597.

Chandra, J., D. M. Jun., P.K. Mukherjee., L. L. Hoyer., T. MacCormick., M. A. Ghannoum. (2001) “Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans* Development, Architecture and drug resistance” *Journal of Bacteriology* 183: 5385-5394.

Chang, R. 1996. “Química” cuarta edición, Mc Graw Hill.

Chi, Z. y Arneborg, N. 1999. “Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*” *Journal of applied microbiology* 88: 1047-1052.

Dutkiewicz R, Schilke B, Knieszner H, Walter W, Craig EA, Marszalek J. 2003 “Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart”, *J Biol Chem*, 29719-27

Farewell, A., Kvin, K., and Nystrom, T. 1998. *uspB*, a new σ^S -regulated gene in *Escherichia coli* which is required for stationary-phase resistance to ethanol. *J. Bacteriol.* 180:6140-6147.

Fried, V.A. and Novick, A. **1973**. Organic solvents as probes for the structure and function of the bacterial membrane: effects of ethanol on the wild type and an ethanol-resistant mutant of *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol. 114:239-248.

Frydman, J. and Hohfeld, J. **1997**. Chaperones get in touch: the chip-hop connection. TIBS Rev. 22:87-92

Gancedo C.y Serrano, R **1989** "Energy yielding metabolism", en the yeast, vol 3, Rose. A. H. Harrison, J. s. London academic press.

Glazer, A.N. y Hiroshi, N. **1993**. Ethanol. Microbial Biotechnology. ASM Press. Washington D.C. pp. 359-391.

Gschaedier, A., Pinal, L., Rodriguez, I., Arellano, M., Herrera, E., Tellez, P. **2000**. "Estudio de la generacion de compuestos organolepticos durante las etapas de cocimiento y fermentación del proceso de producción de tequila" informe tecnico proyecto SIMORELOS.

Gschaedier, A. **2004**. "Ciencia y tecnología del tequila" avances y perspectivas, CIATEJ.

Gupta, R.S. and Goldin, G.B. **1993**. Evolution of *hsp70* gene and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria and eukaryotes. J. Mol. Evol. 37:573-582.

Guthrie, C. y Fink, G. R. **2004** Methods in enzymology "Guide to teast genetics and molecular and cell biology" part A, Elsevier.

Gutierrez-Correa., M **2003** opinion on surface-adhesion fermentation. Agriculture food research (en prensa).

Haejung, A. N., Scopes, R.K., Rodriguez, M., Keshav, K.F. and Ingram L.O. **1991**. Gel electrophoretic analysis of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: identification of alcohol dehydrogenase II as a stress protein. J. Bacteriol. 173:5975-5982.

Hanahan D, **1983** "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids" J Mol Biol, 557-80

Herman, C. and D'Ari, R. **1998**. Proteolysis and chaperones: the destruction/reconstruction dilemma. Curr. Opin. Microbiol. 1:204-209.

Ingram, L.O. and Vreeland, N.S. **1980**. Differential effects of ethanol and hexanol on the *Escherichia coli* cell envelope. J. Bacteriol. 144:481-488.

Ingram, L.O., Alterthum, F., y Conway, T. **1989**. Ethanol production by *Escherichia coli* strains co-expressing *Zymomonas pdc* and *adh* genes. U.S. Patent No. 5000000.

Ingram, L.O., Gomez, P.F., Lai, X., Moniruzzama, M., Wood, B.E., Yomano, L.P., and York, S.W. **1998**. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. Biotechnol. Bioeng. 58:204-214.

Jacques, K. A., Lyons, T. P., Kelsali, D. R. **2003**. "The alcohol textbook" 4 edition, Nottingham university press.

Kawula, T.H. and Lelivelt, M.J. **1994**. Mutations in a gene encoding a new Hsp70 suppress rapid DNA inversion and *bgl* activation, but not *proU* derepression, in *hns-1* mutant *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176:610-619.

Kedzierska, S. and Matuszewska, E. **2001**. The effect of co-overproduction of DnaK/DnaJ/GrpE and ClpB proteins on the removal of heat-aggregated proteins from *Escherichia coli* delta *cplb* mutant cells- new insight into the role of Hsp70 in functional cooperation with Hsp100. FEMS Microbiol. Lett. 204:355-360.

Kosaric, N., Vardar-Sukan, F. y Pieper, H.J. **2001**. The biotechnology of Ethanol. WILEY-VCH. Germany. Pp. 89-115.

Kurtzman, C.P; Fell. J.W. **1998**. The yeast, a taxonomic study, 3rd edition, Elsevier Science, Amsterdam.

Kyung M., Y.. Claire-lise, R., y Douglas, K. **2003** "Ethanol tolerance in the yeast *saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content" Applied and environmental microbiology, 69: 1499-1503.

Lachance, M.A. (1995) "Yeast communities in a natural tequila fermentation", Antonie van Leeuwenhoek, 68: 151-160.

LéJohn, H.B., Cameron, L.E., Yang, B., MacBeath, G., Barker, D.C. and Williams, S.A. **1994**. Cloning and analysis of a constitutive heat shock (cognate) protein 70 gene inducible by L-glutamine. J. Biol. Chem. 269:4513-4522.

Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. **1991**. *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2874-2878.

Macario, A.J.L., Lange, M., Ahring, B.K. and de Macario, E.C. **1999**. Stress genes and proteins in the archaea. Microbiol. Mol.Biol.Rev. 63:923-967.

Martínez, J.A., Covarrubias, R.A., Gosset, L.G., López-Munguía, C.A. and Merino, P.E. **2000**. Biotecnología energética sustentable: uso de la diversidad genómica e ingeniería de vías metabólicas en la producción de etanol. Proyectos de

investigación y desarrollo tecnológico en el campo de la biotecnología. Convocatoria CONACYT 2000.

Morrison y Boyd, **1996**. Química orgánica. 5ª. Edición. ADDISON-WESLEY IBEROAMERICANA. U.S.A. pp. 621-625.

Muhlenhoff U, Gerber J, Richhardt N, Lill R. **2003**. "Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p", EMBO J. 4815-25.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S., y Pfaller, M.A. **2002**. Microbiología médica. 4a. Edición. Mosby-ELSEVIER SCIENCE. Pp. 11-14.

Nelson, D. L. y Cox M. M. **1990** Lehninger principles of biochemistry cuarta edición.

O'Donnell M **1993** "Sliding clamps of DNA polymerases" journal of molecular biology 234: 915-925.

Osman, Y.A. and Ingram, L.O. **1985**. Mechanims of ethanol inibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4.J. Bacteriol. 164: 173-180

Parsell, D.A. and Lindquist, S. **1991**. The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu. Rev. Genet. 27:437-496.

Pinal, L. Nuñez, L. Pinal, L, M. arellano, M. **2003**. "Evaluación del impacto de la edad del *Agave tequilaza Weber* variedad azul en e proceso fermentativo, en las características del producto final así como en los costos de producción del tequila", informe técnico proyectos SIMORELOS.

Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J. Augustyn, O.P.H 1999 "Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the south African wine industry" S. Afr. J. Enol., 20: 61-74.

Pretorius, I. S. 2000 "Tailoring wine yeast for the new millenium novel approaches for the ancient art of winemaking" yeast, 16 675-729

Resendiz, Tamayo. C., 2007. "Obtención y caracterización de mutantes del gen *hscA* de cepas de *Escherichia coli* etanológicas" tesis de maestria, UMSNH.

Rodríguez, B.I.M. 1992. Producción de alcohol por fermentación. Biotecnología HOY. CONACYT, México, D.F. pp. 83-96.

Rodríguez, I., Nuñez, L., Pinal, L. M., Arellano, M., Herrera, E., Pinal, L. 1999 "Asistencia tecnica realizada a una empresa productora de mezcal", informe tecnico CIATEJ.

Salmón, J. M., Vincent, O., Mauricio J. C., Bely, M., Barre, P., 1993 "Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Sacharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fementations", AM. J. Enol. Vitic. 44: 56-64.

Sanchez-Marroquin A., Hope P.H. 1953. Agave juice: Fermentation and chemical composition studies of some species. J. Agri. Food Chem. 1:246-249.

Seaton, B.L. and Vickery, L.E. 1994. A gene encoding a DnaK/hsp70 homologue in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2066-2070.

Silberg, J.J., Hoff, G.K. y Vickery, E.L. 1998. Selection and preliminary characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain mineralizing some isomers in

a branched-chain dodecylbenzene sulfonate mixture. World J. Microbiol. Biotechnol. 12:367-372.

Smeds, A., Varmanen, P., and Palva, A. **1998**. Molecular characterization of a stress-inducible gene from *Lactobacillus helveticus*. J. Bacteriol. 180:6148-6153.

Stryer, L. **1993**. Bioquímica. Reverté. Pp.199-201.

Suzuki, C.K., Rep, M., Diji, J.M.V., Suda, K., Grivell, L.A. and Schatz, G. **1997**. ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. TIBS Rev. 22:118-123.

Téllez, A. **2001**. "Análisis de las variables que influyen en la síntesis de metanol en la producción de tequila durante las etapas de cocimiento y fermentación" tesis de maestría en ciencias en procesos biotecnológicos de la universidad de Guadalajara.

Todd B. R., Gerald R. F. **2001**. "Bakers' Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation" Science 291: 878-881

Tokumoto, U. and Takahashi, Y. **2001**. Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. J. Biochem. 130:63-71.

Vaughan Martín y Martín, A. **1995** "Facts, myths and legends on prime industrial microorganisms", J. Ind. Microbiol., 14: 514-522

Vickery, L.E., Silberg, J.J. and Ta, D.T. **1997**. Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *Escherichia coli*. Protein Sci. 6:1047-1056.

Vigh, L., Maresca, B. and Harwood, J.L. **1998**. "Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?" TIBS. 23:369-373.

Walker, G. M. **1998** "Yeast physiology and biotechnology", John Wiley and Sons. New York.

Wild, J., Kamath-Loeb, A., Ziegelhoffer, E., Lonetto, M., Kawasaki, I., and Gross, C.A. **1992**. Partial loss of function mutations in DnaK, The *Escherichia coli* homologue of the 70-Kda heat shock proteins, affect highly conserved amino acids implicated in ATP binding and hydrolysis. Genetics 89:7139-7143.

Yehia, A.O., and Ingram, L.O. **1985**. Mechanism of Ethanol Inhibition of Fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. J. Bacteriol. 164:173-180.

Yura, T., Kanemori, M., and Morita, T.M. **2000**. Bacterial stress responses. Editores G. Storz y R. Hengge-Aronis. ASM Press, Washington, D.C. pp 3-39, 231-237, 393-399.

Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H. and Dean, D.R. **1998**. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. J. Biol. Chem. 273:13264-13272.

PAGINAS DE INTERNET

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.yeastgenome.org