



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Influencia de la inhibición de la hexocinasa y el  
transporte de glucosa sobre la velocidad de  
producción de etanol en *Saccharomyces cerevisiae*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**CHRISTIHAN EULISES PINEDA GARCÍA**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor: José Mariano García Garibay**

**VOCAL:**                           **Profesor: Sobeida Sánchez Nieto**

**SECRETARIO:**               **Profesor: Héctor Quezada Pablo**

**1er. SUPLENTE:**               **Profesor: Agustín Reyo Herrera**

**2° SUPLENTE:**               **Profesor: Maricarmen Quirasco Baruch**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA  
"IGNACIO CHÁVEZ"**

**ASESOR DEL TEMA: DR. HÉCTOR QUEZADA PABLO**

---

**SUSTENTANTE: CHRISTIHAN EULISES PINEDA GARCÍA**

---

**"EL PRESENTE TRABAJO SE FINANCIÓ CON RECURSOS PROVENIENTES DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL DISTRITO FEDERAL (PROYECTO PICS08-5) Y DEL CONACYT (PROYECTO 106583)".**

***A los que viven por siempre en mi corazón:***

***Mamá, Edgar y Efrén.***

***El guerrero invencible no es aquel que ha ganado mil batallas,***

***sino el que se ha vencido a sí mismo.***

***Sun Tzu***

## ÍNDICE

1. Resumen .....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Los biocombustibles como energía renovable.....	3
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio.....	4
2.3. Glicólisis.....	5
2.4. Fermentación alcohólica mediada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
2.5. Principales hipótesis sobre la regulación del flujo glicolítico.....	7
2.6. Modulación de la hexocinasa mediante trehalosa 6-fosfato.....	8
2.7. Transportadores de hexosas.....	10
2.8. Importancia del ATP en la vía glicolítica.....	12
3. Hipótesis .....	14
4. Objetivo.....	14
4.1. Objetivos particulares.....	14
5. Material y métodos.....	15
5.1. Diseño de oligonucleótidos.....	15
5.2. Amplificación exponencial de ADN por PCR.....	16
5.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	18
5.4. Purificación de ADN.....	19
5.5. Ligación a vector <i>pJET1.2</i> .....	19
5.6. Transformación de bacterias competentes.....	20
5.7. Digestión con enzimas de restricción.....	21
5.8. Purificación de ADN plasmídico.....	21

5.9. Desfosforilación de ADN.....	22
5.10. Clonación en el vector episomal para levadura <i>pRS426</i> .....	23
5.11. Transformación de levaduras.....	24
5.12. Hibridación tipo Western Blot .....	26
5.13. Obtención de extractos para ensayos de actividad.....	27
5.14. Ensayos de actividad de la hexocinasa.....	28
5.15. Determinación de la concentración de proteínas por Lowry .....	29
5.16. Fermentaciones.....	30
5.17. Cuantificación de etanol por cromatografía de gases.....	31
5.18. Determinación del consumo de glucosa en la fermentación .....	32
5.19. Determinación de la velocidad de producción de etanol.....	33
6. Resultados y discusión.....	34
6.1. Clonación de los genes <i>SpHXK2</i> y <i>HXT1</i> en el plásmido <i>pRS426</i> .....	34
6.2. Sobre-expresión de la hexocinasa y el transportador.....	36
6.3. Incremento en la actividad de la hexocinasa por <i>SpHXK2</i> .....	38
6.4. Desregulación de la parte alta de la glicólisis.....	41
6.5. Caracterización cinética de la hexocinasa.....	43
6.6. Fermentación alcohólica en condiciones microaerofílicas.....	46
6.7. Fermentación alcohólica con benzoato de sodio.....	47
7. Conclusión.....	50
8. Perspectivas.....	50
9. Bibliografía.....	51
10. Apéndice.....	55

## 1. RESUMEN

En la actualidad se está intentando reemplazar parcialmente a los combustibles fósiles para reducir las emisiones de gases y disminuir así el calentamiento global. Por, ello se ha fomentando el uso de biocombustibles con el fin de reducir el problema de contaminación en el mundo. El bio-etanol es una de las alternativas más promisorias.

El principal organismo utilizado en la fermentación alcohólica es *Saccharomyces cerevisiae* debido a la alta capacidad de convertir la glucosa en etanol. Diversos estudios se han enfocado a entender la regulación de la vía glicolítica en *Saccharomyces cerevisiae*, levadura encargada de llevar a cabo la conversión de azúcares a etanol. Sin embargo no se han entendido a fondo los mecanismos que regulan la velocidad de producción de etanol. La hexocinasa, la fructosa 6-fosfato cinasa tipo I y la piruvato cinasa son las enzimas que se han propuesto como determinantes en la velocidad de producción de etanol. La hexocinasa fosforila la glucosa interna y la transforma a glucosa 6-fosfato y es inhibida por la trehalosa 6-fosfato. Se ha propuesto que esta inhibición limita la velocidad de producción de etanol. Adicionalmente, el transporte de glucosa ha sido señalado como principal punto de control cuando la levadura se cultiva a bajas concentraciones de glucosa. Por otro lado se ha reportado que al aumentar la demanda de ATP se incrementa el flujo glucolítico dos veces.

En el presente proyecto se evaluó el efecto de la sobre-expresión simultánea de una forma de hexocinasa insensible a inhibición por trehalosa 6-fosfato y del principal transportador de hexosas. El incremento en la expresión del transportador *HXT1* fue de 3.3 veces y de la hexocinasa insensible a moduladores fue de 2 veces. El aumento en la actividad de la hexocinasa correspondió al 40 %. Al comparar las



capacidades fermentativas de la cepa recombinante con una cepa control no se encontraron diferencias significativas, así mismo solamente al aumentar la demanda de ATP con benzoato de sodio se observó un incremento en la velocidad de producción de etanol.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. LOS BIOCOMBUSTIBLES COMO ENERGÍA RENOVABLE

La combustión de los combustibles fósiles, carbón, petróleo, o gas da lugar a productos como: agua, CO<sub>2</sub>, CO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, etc. Algunos de éstos se conocen como gases de efecto invernadero, estos gases afectan el clima global, ya que la radiación solar de onda corta puede atravesar la atmósfera y aunque una parte es reflejada, la mayor parte es absorbida por la superficie terrestre, calentando la atmósfera (Scragg, 2001).

Se han propuesto fuentes alternativas de energía producidas naturalmente como los biocombustibles. Estudios han demostrado que los biocombustibles emiten entre el 40 % y 80 % de gases de efecto invernadero en comparación con los combustibles fósiles (Comisión Europea, 2001). En el siglo pasado la utilización de combustibles fósiles ha incrementado drásticamente el nivel de gases de efecto invernadero en la atmósfera de la tierra (Ballesteros *et al*, 2006). Estos hechos y el ineludible agotamiento de las reservas de hidrocarburos y el aumento correlativo de los precios de combustibles fósiles, plantea la utilización de los biocombustibles.

Se entiende por biocombustible la materia (sólido, líquido y gas) de origen biológico que puede ser utilizada en la generación de energía y calor, y que se diferencia de los combustibles fósiles porque los biocombustibles son considerados como energía renovable (Camps y Marcos, 2008). El bioetanol o alcohol etílico es el biocombustible más producido en el mundo, hoy en día su elaboración representa el 94% de la producción total de biocombustibles (Balat *et al*, 2008). El etanol puede producirse a partir de materias primas que contienen azúcares fermentables mediante la vía glicolítica y la fermentación alcohólica mediada por *Saccharomyces cerevisiae*.

Una mayor comprensión de la glicólisis mediante estudios de ciencia básica ayudará a obtener cepas de uso industrial para la biosíntesis de etanol.

## 2.2. *Saccharomyces cerevisiae* COMO MODELO DE ESTUDIO

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura anaerobia facultativa que a nivel biotecnológico es de gran importancia debido a sus aplicaciones industriales clásicas en la fermentación de cerveza, vino y en la producción de pan. Las fuentes de carbono preferidas de la mayoría de las especies de levadura entre ellas *S. cerevisiae* son la glucosa, fructosa y manosa. En la presencia de glucosa e independientemente de la concentración de oxígeno son reprimidas las síntesis de enzimas necesarias para la utilización de disacáridos (sacarosa, maltosa o galactosa), fuentes de carbono no fermentables (etanol, acetato, glicerol, piruvato y lactato) como también el desarrollo mitocondrial (Dickinson, 1999). La glucosa es la fuente de carbono favorita en el metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae*, empleando la ruta Embden-Meyerhof, resultando en la formación de etanol. A altas concentraciones de azúcares fermentables, las tasas del flujo glucolítico en *S. cerevisiae* pueden alcanzar niveles muy altos que conducen a una producción de etanol considerable (Barnett *et al*, 1990). Por ejemplo, en uno de los procesos más explotado por los humanos como lo es la fermentación de la uva, las levaduras se exponen a un 20 % de azúcares (1.1 M de la mezcla de glucosa y fructosa) y, al final del proceso, a un medio sin azúcares y con un 10 % (2.2 M) de etanol (Hohmann y Mager, 1997). Se puede tratar a esta levadura con una gama extremadamente amplia de concentraciones de azúcares y efectivamente puede metabolizar la glucosa en concentraciones de 1 a 1.5 M (Weusthuis *et al*, 1994).

### 2.3. GLICÓLISIS

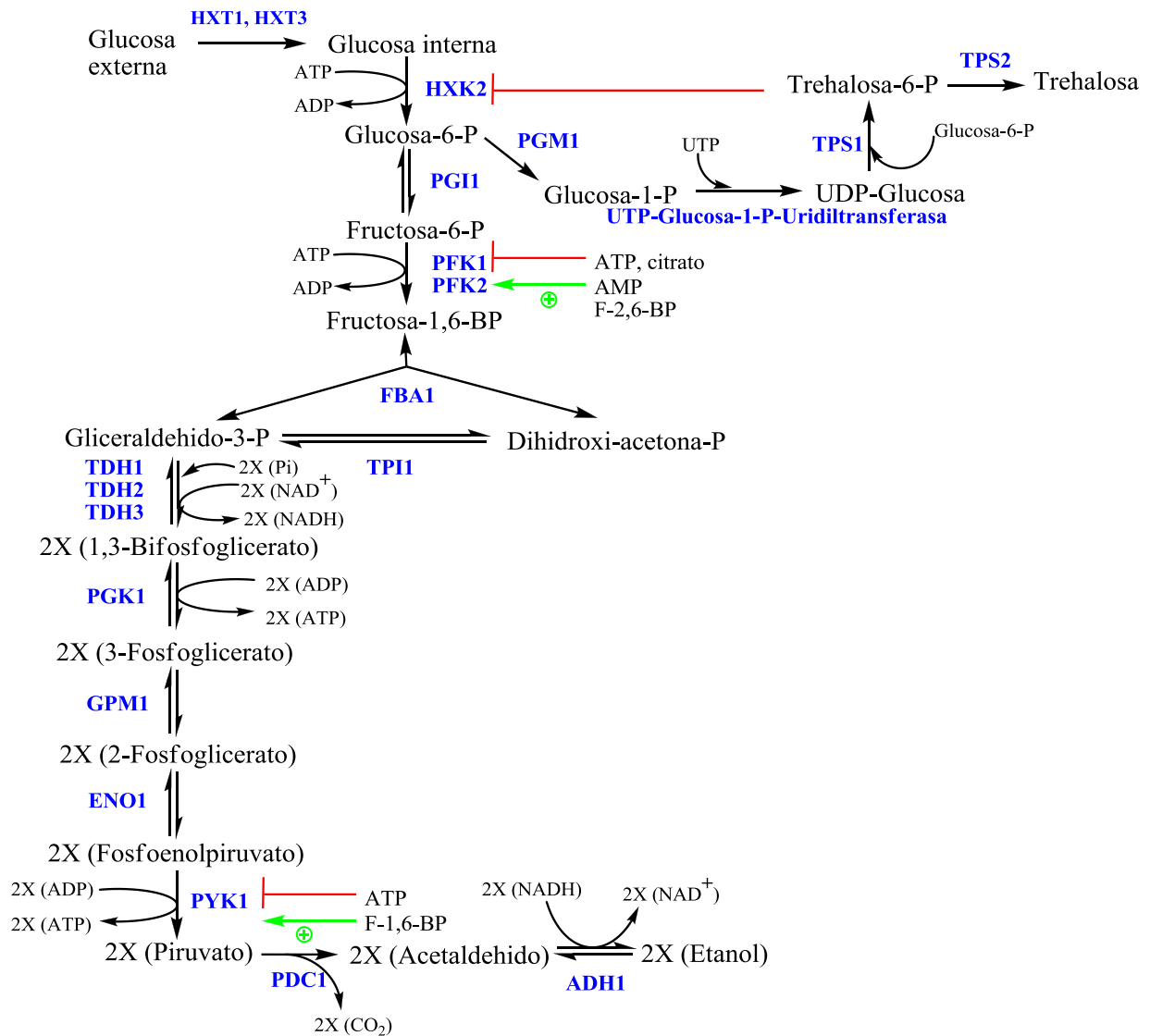
Estrictamente la glicólisis es la serie de reacciones acopladas que rompen una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, lo que causa liberación de energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP), aunque en la levadura muchas veces también se incluye hasta la formación de etanol (figura 1). La glicólisis es la vía central del metabolismo de carbohidratos y se considera universal, ya que prácticamente todos los organismos la utilizan para obtención de energía. En términos rigurosos, la glicólisis es una vía anaerobia. En organismos anaerobios produce lactato o etanol por medio de un proceso conocido como fermentación y en los organismos aerobios, el piruvato obtenido en la última reacción de la vía glicolítica se descarboxila en la matriz mitocondrial, como preámbulo para oxidarse posteriormente en el ciclo de Krebs, y obtener mayor cantidad de energía. La reacción global de la glicólisis tomando en cuenta los rendimientos netos son los siguientes (Díaz, 2007).



La importancia de la vía glicolítica en *S. cerevisiae* reside en que entre el 30 al 60 % de la proteína soluble son enzimas de la glicólisis, dependiendo del estado fisiológico de la levadura (Dickinson, 1999).

### 2.4. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA MEDIADA POR *Saccharomyces cerevisiae*

En la fermentación alcohólica *Saccharomyces cerevisiae* convierte la glucosa en etanol a través de la ruta de la glicólisis que produce piruvato, el piruvato se descarboxila (reacción catalizada por la piruvato descarboxilasa) para producir acetaldehído liberando CO<sub>2</sub> y se reduce para producir etanol, la reducción del acetaldehído depende de NADH y es catalizada por la alcohol deshidrogenasa.



**Figura 1.** Glicólisis de *Saccharomyces cerevisiae*. El doble sentido de las flechas denota la reversibilidad de las reacciones. Se muestran los genes que codifican para las enzimas y los transportadores predominantes a altas concentraciones de glucosa, además también se muestran los genes relacionados con la síntesis de trehalosa. *HXT1*, *HXT3* – transportador de hexosas; *HXK2* – hexocinasa; *PGI1* – fosfoglucosa isomerasa; *PFK1*, *PFK2* – fructosa 6-fosfato cinasa; *FBA1* – fructosa 1,6 bifosfato aldolasa; *TPI1* – triosa fosfato isomerasa; *TDH1*, *TDH2*, *TDH3* – gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; *PGK1* – fosfoglicerato cinasa; *GPM1* – glicerofosfato mutasa; *ENO1* – enolasa; *PYK1* – piruvato cinasa; *PDC1* – piruvato descarboxilasa; *ADH1* – alcohol deshidrogenasa; *PGM1* – fosfoglucosa mutasa; *TPS1* – trehalosa 6-fosfato sintasa; *TPS2* – trehalosa 6-fosfato fosfatasa. Se señala con una línea orthogonal las inhibiciones y con flechas grises las activaciones.

## 2.5. PRINCIPALES HIPÓTESIS SOBRE LA REGULACIÓN DEL FLUJO GLICOLÍTICO

Anteriormente se ha argumentado que el control del flujo metabólico de la vía glicolítica no se puede atribuir a un único paso limitante, los llamados cuellos de botella metabólicos, ya que Schaaff *et al* (1989) mostró que la sobreproducción de enzimas glicolíticas individuales no tiene ningún efecto en la velocidad de producción de etanol, por lo que se sugiere que el control del flujo glicolítico puede ser compartido entre varias o incluso todas las enzimas glicolíticas. Considerando que el control del flujo glicolítico es compartido por varias enzimas se sobre-expresaron simultáneamente las últimas siete enzimas de la vía (*TDH3*, *PGK1*, *GPM1*, *ENO2*, *PYK1*, *PDC1* y *ADH1*) sin embargo no se tuvo ningún efecto sobre la producción de etanol (Hauf *et al*, 1999).

Se ha propuesto que el control del flujo glicolítico en *Saccharomyces cerevisiae* está mediado principalmente por la modulación de la actividad enzimática mediada por sustratos, productos y metabolitos efectores (Daran-Lapujade *et al*, 2007), las enzimas hexocinasa, fructosa 6-fosfato cinasa y la piruvato cinasa se han propuesto como enzimas controladoras por que son moduladas por activadores e inhibidores además de que éstas son irreversibles por lo que se dice que están lejos del equilibrio. La fructosa 6-fosfato cinasa tipo I está regulada positivamente por fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6-BP) y AMP, y es inhibida por ATP. La actividad de la piruvato cinasa es incrementada por la fructosa-1,6-bisfosfato (F1,6-BF) y es inhibida por ATP. La hexocinasa es inhibida por trehalosa-6-fosfato (Blázquez *et al*, 1993). Estudios han demostrado que la hexocinasa de *Schizosaccharomyces pombe* no es inhibida por la trehalosa-6-fosfato (Blázquez *et al*, 1994).

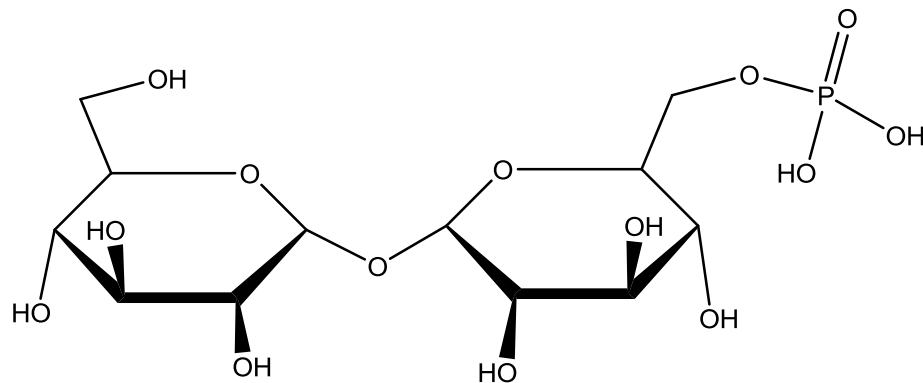
Así mismo también se ha sugerido que el control del flujo glicolítico se encuentra fuera de la vía glicolítica como en el transportador de hexosas, en donde se ha demostrado que la mayoría del control del flujo glicolítico reside en el transporte cuando la velocidad de transporte es baja (Elbing *et al*, 2004). Adicionalmente la demanda de ATP incrementa la velocidad de producción de etanol hasta dos veces a través de las enzimas glicolíticas (Duran-Lapujade *et al*, 2007) por lo que dicha demanda también podría ser importante en el control del flujo glicolítico.

## 2.6. MODULACIÓN DE LA HEXOCINASA MEDIANTE TREHALOSA 6-FOSFATO

En general la biosíntesis de trehalosa en la levadura *S. cerevisiae* se da mediante dos reacciones enzimáticas consecutivas catalizadas por la trehalosa 6-fosfato (*T6P*) sintasa y la trehalosa 6-fosfato fosfatasa, las dos enzimas están codificadas por los genes *TPS1* y *TPS2* respectivamente (figura 1). La trehalosa es un disacárido de reserva y es un protector de proteínas y membrana ante daño celular causado por condiciones adversas como el estrés térmico; además la síntesis de trehalosa está ampliamente distribuida en plantas y hongos. La importancia de la trehalosa en la glicólisis de *S. cerevisiae* recae en que su precursor trehalosa 6-fosfato (figura 2) inhibe competitivamente la hexocinasa pero no la glucocinasa *in vitro*, a diferencia de la hexocinasa de mamíferos que se inhibe por glucosa 6-fosfato. La hexocinasa *Hxk2* presenta una mayor inhibición que la hexocinasa *Hxk1*, sus constantes de disociación enzima-inhibidor ( $K_{i_{T6P}}$ ) son 0.04 y 0.2 mM correspondientemente (Blázquez *et al*, 1993) y la concentración de trehalosa 6-fosfato intracelular es de 0.2 mM (Larsson *et al*, 2000). Esto significa que *in vivo* *Hxk2* estará fuertemente inhibida por trehalosa 6-

fosfato. Cabe aclarar que *Hxk2* es la isoforma de hexocinasa predominante en altas concentraciones de glucosa (> 50 mM).

La importancia de la trehalosa 6-fosfato para la regulación del flujo glicolítico también se refleja en el hecho de que la supresión del gen *TPS1* da como resultado un fenotipo con una glicólisis aparentemente desregulada. Las mutantes muestran hiperacumulación de azúcares fosforilados y como resultado las células depletan su contenido de ATP y mueren. Sin embargo, la ausencia de un efecto directo sobre la actividad de la hexocinasa por trehalosa 6-fosfato no es el único factor que podría estar implicado en la muerte celular (Bonini *et al*, 2003).



**Figura 2.** Trehalosa 6-fosfato. Disacárido no reductor compuesto de dos unidades de glucosa unidas mediante un enlace  $\alpha,\alpha$  - 1,1 y un grupo fosfato en el hidroxilo del carbono 6 de una de las unidades de glucosa.

En un estudio realizado por Bonini *et al*, (2003) en donde se expresó una hexocinasa insensible a trehalosa 6-fosfato de *Schizosaccharomyces pombe*, mediante una transformación integrativa a cromosoma bajo el control del promotor de la fosfoglicerato cinasa, se obtuvo un aumento de la actividad de la hexocinasa del 60 %, sin embargo no se aumentó la velocidad de producción de etanol.

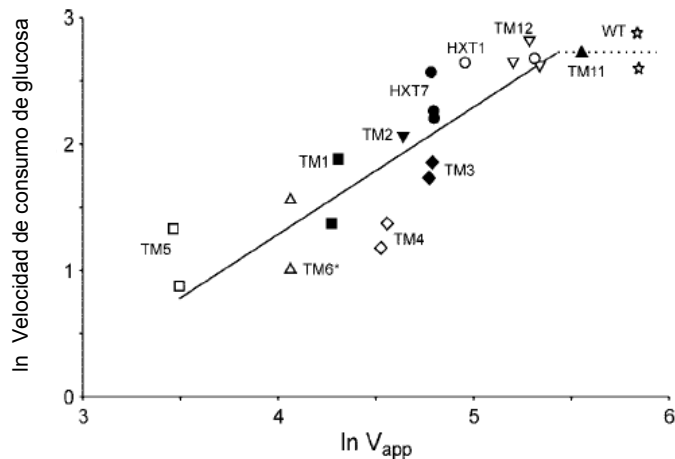


## 2.7. TRANSPORTADORES DE HEXOSAS

El transporte a través de la membrana plasmática es el primer paso para la utilización de las hexosas, *S. cerevisiae* es muy eficiente ya que cuenta con 20 genes diferentes relacionados con proteínas transportadoras, sin embargo solamente 6 de estos genes (*HXT1*, 2, 3, 4, 6, 7) codifican para transportadores metabólicamente relevantes en la captación de glucosa, fructosa y manosa (Reifenberger *et al*, 1995). En esencia, el transporte de hexosas en levadura está mediado exclusivamente por un sistema de difusión facilitada, pero además tiene un sistema simporte de protones para absorción de disacáridos como la maltosa y la trehalosa (Lagunas, 1993).

Los transportadores que son inducidos a altas concentraciones de glucosa (> 50 mM) son: *HXT1* y *HXT3*, estos transportadores tienen una baja afinidad en el transporte de hexosas, sus *K<sub>m</sub>* para glucosa son de 90 y 55 mM respectivamente (Reifenberger *et al*, 1997). Los transportadores que se inducen a bajas concentraciones de glucosa tienen una mayor afinidad por glucosa, el transportador *HXT6* y *HXT7* tiene una *K<sub>m</sub>* por glucosa de 1.5 mM. La expresión del transportador *HXT1* es inducida 300 veces a altos niveles de glucosa (> a 200 mM) pero no por galactosa, maltosa o rafinosa (Boles *et al*, 1997). El transportador *HXT3* además se induce a bajas concentraciones de glucosa (5 mM), pero solo cuando hay glucosa en el medio y contribuye en la captación de glucosa justo después de la adición de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo, igualmente asiste cuando pasan las células a fase estacionaria.

Cuando se determinó el grado de control del flujo glicolítico que recae en el transporte, se obtuvo un coeficiente de control de flujo de 1.2. El coeficiente de control de flujo es una medida del grado en el que una enzima o transportador, determinan el flujo a través de una vía metabólica. Los valores de estos coeficientes pueden variar entre 0 y 1, de modo que si el coeficiente de control de flujo determinado para el transporte es igual a 1.2 significa que el transporte es la etapa limitante de la vía en esas condiciones. El control del transporte es alto en condiciones de  $V_{max}$  menor a  $200 \text{ nmol de glucosa transportada} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína (figura 3), sin embargo la cepa tipo silvestre (*WT*) tiene una  $V_{max}$  de  $330 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  cuando se cultiva en medios con 110 mM de glucosa, por lo tanto se dice que el transporte está excedido en condiciones de alta glucosa. Para el experimento que se muestra en la figura 3 se utilizó una cepa a la cual se le quitaron los transportadores necesarios para crecer en un medio con glucosa, posteriormente se transformó la cepa con transportadores quimeras. Los transportadores quimeras tienen diferentes porciones de los transportadores *HXT1* y *HXT7* que son transportadores de baja y alta afinidad por glucosa, cada transportador quimera está bajo el control del promotor del transportador *HXT7* con el fin de que la inducción sea la misma para cada transportador.

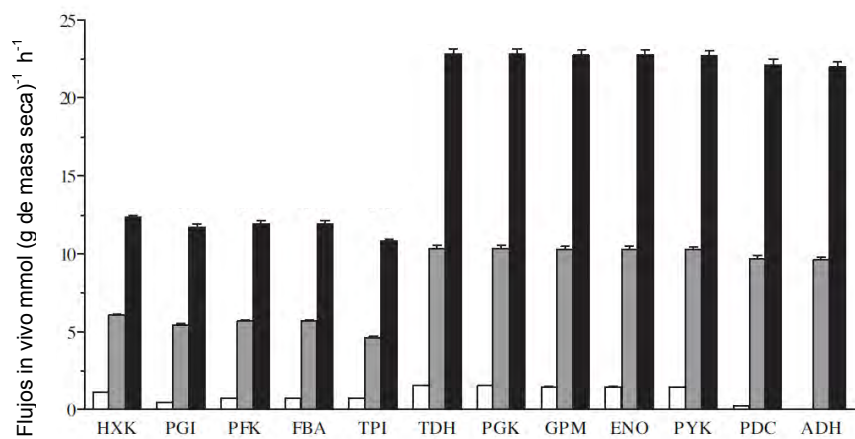


**Figura 3.** Control del flujo glicolítico del transporte en *S. cerevisiae*. In de la velocidad de consumo de glucosa ( $\text{mmol de glucosa} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) vs el In de la tasa de captación de glucosa aparente “ $V_{max}$ ” ( $\text{nmol de glucosa} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína). Elbing *et al*, 2010. La pendiente de la línea recta inclinada refleja el alto control de flujo que ejerce el transporte sobre la vía glicolítica a velocidades de transporte menores a  $200 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína ( $\text{In } V_{app} < 5.4$ ). La línea recta punteada horizontal refleja el bajo nivel de control de flujo que ejerce el transporte a las velocidades que tiene la cepa silvestre (WT, ☆) cercanas a  $330 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  ( $\text{In } V_{app} = 5.8$ ).

## 2.8. IMPORTANCIA DEL ATP EN LA VIA GLICOLITICA

El ATP y los nucleótidos de adenina son de fundamental importancia para la regulación del flujo glicolítico. En primer lugar, el ATP es uno de los productos, además diversos nucleótidos actúan como sustratos o productos en la mayoría de las reacciones que se supone son importantes en la velocidad de producción de etanol, es decir, la hexocinasa, fructosa 6-fosfato cinasa y la piruvato cinasa. Además, el ATP es también un regulador de la inhibición alostérica de la fructosa 6-fosfato cinasa (Larsson *et al*, 1997). Finalmente, se ha sugerido que la tasa de consumo de ATP, es decir, la demanda de ATP desempeña un papel en la regulación de la glicólisis, ya que se ha observado que cuanto mayor sea el contenido de ATP menor será la tasa del flujo glicolítico (Larsson *et al*, 1997).

En un estudio se utilizó benzoato de sodio para aumentar la demanda de ATP (figura 4) y se aumentó el flujo dos veces (Duran-Lapujade *et al*, 2007). Cuando el benzoato se encuentra como ácido benzoico ( $pK_a = 4.19$ ) éste puede difundir fácilmente por la membrana celular y llegar al citosol donde se tiene un pH de 6 a 7, por lo tanto el ácido benzoico se desprotona y finalmente acidifica el interior de la célula afectando la homeostasis de protones. Para contender ante la acidificación del citosol *S. cerevisiae* activa una  $H^+$  - ATPasa de membrana plasmática (*Pma1*) la cual hidroliza ATP para bombear protones fuera de la célula aumentando la demanda de ATP además de que se activa un sistema de transporte simporte para eliminar benzoato y protones.



**Figura 4.** Niveles de los flujos *in vivo* de las enzimas glicolíticas. *HXK* – hexocinasa; *PGI* – fosfoglucoasa isomerasa; *PFK* – fructosa 6-fosfato cinasa; *FBA* – fructosa 1,6 bifosfato aldolasa; *TPI* – triosa fosfato isomerasa; *TDH* – gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; *PGK* – fosfoglicerato cinasa; *GPM* – glicerofosfato mutasa; *ENO* – enolasa; *PYK* – piruvato cinasa; *PDC* – piruvato descarboxilasa; *ADH* – alcohol deshidrogenasa. Las barras blancas representan el cultivo en medio aerobio, las barras grises representan el cultivo en medio anaerobio y las barras negras representan el cultivo en medio anaerobio con benzoato de sodio 2 mM. (Duran-Lapujade *et al* 2007).

### 3. HIPÓTESIS

La sobre-expresión simultánea de una forma de hexocinasa insensible a inhibición por trehalosa 6-fosfato y del principal transportador de hexosas aumentará la velocidad de producción de etanol en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

### 4. OBJETIVO

Evaluar el efecto de la sobre-expresión simultánea de una forma de hexocinasa insensible a inhibición por trehalosa 6-fosfato y del principal transportador de hexosas sobre la velocidad de producción de etanol.

#### 4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Construcción de una cepa recombinante en la que se sobre-expresen simultáneamente una hexocinasa que no se inhiba por trehalosa 6-fosfato y el principal transportador de hexosas en altas concentraciones de glucosa.
- Determinar los niveles de sobre-expresión del transportador de hexosas *Hxt1* y de la hexocinasa *SpHxk2*, así mismo determinar el aumento en la actividad de la hexocinasa.
- Determinar la capacidad de fosforilación de glucosa *in vivo* de la hexocinasa heteróloga de *S. pombe* mediante la determinación de los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ).
- Comparación de la cepa recombinante con la cepa silvestre en sus capacidades fermentativas en presencia y ausencia de benzoato de sodio.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Con el fin de realizar la amplificación selectiva es necesario conocer la secuencia de ADN de interés. Dicha información se obtuvo de la base de datos de *Schizosaccharomyces pombe* GeneDB (<http://old.genedb.org/genedb/pombe/>) y *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (<http://yeastgenome.org/>). Estos datos se utilizaron para diseñar los cebadores (amplímeros) los cuales son específicos para las secuencias flanqueantes tanto del marco de lectura de la hexocinasa 2 de *S. pombe* y el terminador *HXT7*, así como del promotor del transportador *HXT1* (tabla 1). El diseño de cebadores se facilitó mediante la utilización de programas como el Oligo calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/olicalc/>). En el diseño de oligonucleótidos se consideraron ciertos parámetros para reducir la probabilidad de que se hibriden los cebadores en otros sitios del ADN que no sean los deseados, dichos parámetros se mencionan a continuación.

- Evitar secuencias repetidas de ADN.
- La longitud debe ser de preferencia de 20 a 30 nucleótidos.
- El contenido de GC debe ser de 40 a 60 % con una distribución uniforme.
- La temperatura de fusión ( $T_m$ , se define como la temperatura que corresponde al punto medio en la transición de la forma de doble cadena a la de cadena única de ADN). Los valores de  $T_m$  calculados para los dos cebadores usados juntos no debe variar en más de 5 °C.

- La secuencia 3' de un cebador no debe ser una secuencia complementaria de ninguna región del otro cebador en la misma reacción.
- Deben evitarse repeticiones invertidas o cualquier secuencia autocomplementaria mayor a 3 pb de largo (Strachan, 2006).

**Tabla 1.** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la construcción del gen heterólogo de la hexocinasa de *S. pombe*.

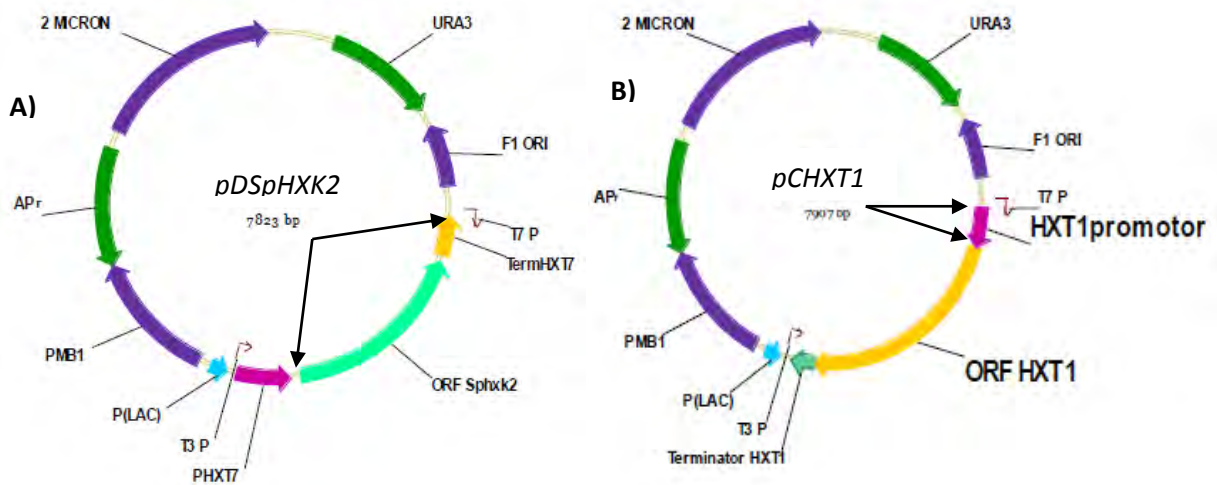
Nombre	Secuencia (5'→3')
<b>MarOFoNheI</b>	GCGCGC <b>GCTAGC</b> <u>ATGGAGGCTAATTTTCAACAAGCTGTT</u>
<b>MarTReNotI</b>	GCGCGC <b>GCGGCCGC</b> <u>GACGTGGGTCTGCAGGCCAAAATTGG</u>
<b>MarPFoXhoI</b>	GCGCGC <b>CCTCGAG</b> <u>GATAGAAGAATACCACTCATATGACGTGG</u>
<b>MarPReNheI</b>	GCGCGC <b>GCTAGC</b> <u>GATTTTACGTATATCAACTAGTTGACGATTATG</u>

Los primeros seis nucleótidos de los oligonucleótidos (GCGCGC) corresponden a lo que se le denomina “grapa” los cuales ayudan a la estabilidad de los oligonucleótidos, posteriormente se encuentra una secuencia en negritas que es específica para el reconocimiento de enzimas de restricción tipo II. Las secuencias que se encuentran subrayadas corresponden a los sitios de unión de las zonas flanqueantes a amplificar.

## 5.2. AMPLIFICACIÓN EXPONENCIAL DE ADN POR PCR

Con el uso de los oligonucleótidos se prosiguió a la amplificación del gen *HXK2* de *S. pombe*, el terminador *HXT7* y de promotor *HXT1* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (tabla 2). El promotor es una secuencia de ADN a la que se le unen factores de transcripción que regulan la unión y frecuencia de la transcripción de la región codificante adyacente por parte de la RNA polimerasa. El terminador es una secuencia de ADN que esta después del codón de término, es necesaria para detener la transcripción e incluye la señal de poliadenilación. En el laboratorio se cuenta con el plásmido *pDSpHXK2* (Arcos, 2011) el cual tiene el promotor *PHXT7*, el gen *SpHXK2*

y el terminador *TermHXT7* (figura 5A), de este plásmido se amplificó el gen *SpHxk2* y el terminador *TermHXT7*. También se tiene el plásmido *pCHXT1* (Hernández, 2012) en donde se amplificó el promotor *HXT1* (figura 5B). La mezcla de reacción es la siguiente: 10  $\mu\text{L}$  de buffer 5X *pfu* HF, 0.2 mM de dNTPs, 0.15 nmol/ $\mu\text{L}$  de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido, 1  $\mu\text{g}$  aproximadamente de templado y una unidad ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ) de DNA polimerasa *pfu* y la cantidad de agua necesaria para llevar a un volumen de 50  $\mu\text{L}$ .



**Figura 5.** Plásmidos *pDSpHxk2* y *pCHXT1*. Se muestran las características del plásmido en negritas. Se señalan las regiones a amplificar para la construcción del gen heterólogo de la hexocinasa de *S. pombe*.



**Tabla 2.** Programa del termociclador en la amplificación exponencial por PCR del gen y el terminador *SpHxK2-HxT7* y el promotor *HxT1*.

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (SpHxK2-HxT7)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura (HxT1)</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización</b>	98 °C	30 seg.	98°C	30 seg.
<b>Desnaturalización</b>	98 °C	10 seg.	98°C	10 seg.
<b>Alineamiento</b>	72 °C	30 seg.	61°C	30 seg.
<b>Extensión</b>	72 °C	30 seg.	72°C	30 seg.
<b>Extensión</b>	72 °C	10 min.	72°C	10 min.
	4 °C		4°C	

Se realizan 35 ciclos entre los pasos de la segunda desnaturalización, alineamiento y la primera extensión.

### 5.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

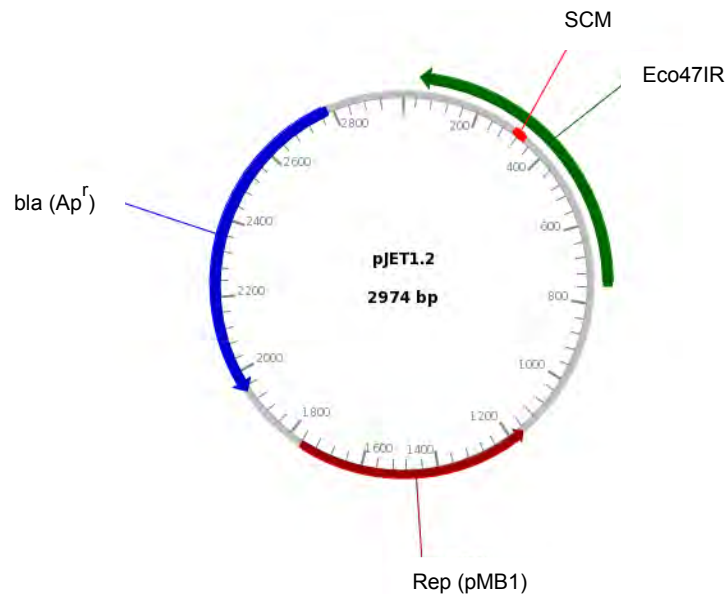
Este método de separación de ADN se utilizó ampliamente tanto para purificar los productos de los PCR y las digestiones con enzimas de restricción, además de visualizar el patrón de bandas que confirmaron que las ligaciones habían sido eficientes. En la purificación de ADN se preparó el gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio ( $6 \times 10^{-4}$  mg/mL). En caso de la visualización de patrones de bandas se preparó el gel de agarosa de 1-1.2% conservando la concentración de bromuro de etidio. El marcador de peso molecular utilizado fue el 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen), a cada muestra se le adicionó buffer de muestra 5X (0.25 % azul de bromofenol, 0.25 % xilen-cianol y 30 % glicerol). El gel se situó en una cámara de electroforesis, en la cual tenía buffer de corrida TBE 0.5X (44.6 mM tris, 0.5 mM EDTA y 45 mM ácido bórico), la corriente aplicada fue de 100 volts. La detección de bandas se realizó en un transiluminador con luz UV, el bromuro de etidio intercalado en el ADN emitió fluorescencia al irradiarse.

#### 5.4. PURIFICACIÓN DE ADN

Posterior a la detección de bandas de interés en el gel de agarosa, éstas se cortan y se purifican con el kit WisardSV Gel and PCR Clean-Up system (Promega), el método consiste en disolver la banda de agarosa en una solución llamada Membrane Binding Solution (4.5 M guanidina isotiocianato y 0.5 M de acetato de potasio pH = 5) a 65°C durante 10 min, la disolución se incuba en una columna de silica 1 min, posteriormente se centrifuga a 14000 rpm 1 min. El ADN se adhiere a la columna y se hacen lavados con la solución Membrane Wash Solution (etanol al 95 % y acetato de potasio 10 mM pH = 5); posterior a la evaporación del etanol, el ADN se eluye de la columna con agua libre de nucleasas.

#### 5.5. LIGACIÓN A VECTOR *pJET1.2*

Los fragmentos de ADN obtenidos en la PCR se unieron covalentemente al plásmido *pJET1.2* (figura 6) (vector de clonación) mediante la reacción catalizada por la T4 DNA ligasa; a continuación se da la mezcla de reacción de ligación: 10 µL de buffer de reacción 2X, 2 µL del producto de reacción de PCR, 2.5 ng/µL de el plásmido *pJET1.2*, 6 µL de agua libre de nucleasas, 5 U de T4 DNA ligasa.



**Figura 6.** Plásmido *pJET1.2*. Como marcador genético el plásmido tiene resistencia a ampicilina (*bla* (*Ap<sup>r</sup>*)). El sitio donde se une el producto de PCR con extremos romos se encuentra en el nucleótido 371 en el sitio de clonación múltiple (SCM). La secuencia Rep (*pMB1*) indica el sitio de inicio de la replicación. El gen *Eco47IR* codifica para una endonucleasa no específica que es letal para *E. coli*.

## 5.6. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

A las células que han recibido un tratamiento apropiado para llevar a cabo la introducción de material genético se denominan células competentes (Sánchez, 2011). En la transformación de *Escherichia coli* se utilizó el método de choque térmico en donde se trataron las bacterias con  $\text{CaCl}_2$  0.1 M para aumentar la permeabilidad de la membrana. Alícuotas de bacterias competentes de 200  $\mu\text{L}$  se descongelaron y se pusieron en contacto con todo el volumen de la reacción de ligación y se incubaron durante 30 min en baño hielo, posteriormente se realizó el choque térmico  $45^\circ\text{C}$  durante 45 seg permitiendo que el plásmido recombinante entre en las bacterias y a continuación se sumergieron en baño hielo durante 2 min para que se cierren los poros de la membrana. A las bacterias transformantes se les adiciona 800  $\mu\text{L}$  de

medio LB líquido y se incuban 1 h a 37°C, posteriormente se centrifugaron a 400 rpm 5 min, se eliminó 750 µL de medio y se resuspendió el pelet, finalmente se inocularon en medio LB ampicilina (100 µg/mL). El plásmido tiene como marcador genético la resistencia a ampicilina.

### 5.7. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las endonucleasas de restricción son enzimas que cortan el ADN. Las nucleasas de restricción tipo II reconocen secuencias palindrómicas “secuencia de bases que se leen igual de derecha a izquierda que de izquierda a derecha en ambas cadenas” (Strachan, 2006). Estas enzimas fueron utilizadas para confirmar que la ligación fue exitosa, los fragmentos resultantes de la digestión dieron un patrón de bandas definidos. También estas enzimas se utilizaron con el fin de formar extremos cohesivos (los puntos de corte no se encuentran en el eje de simetría, de tal manera que los fragmentos contienen los llamados salientes 3' y 5' (Strachan, 2006)) lo que permite posterior a una ligación, la obtención del gen heterólogo de la hexocinasa 2 de *S. pombe* (promotor *HXT1* - marco de lectura *SpHXK2* – terminador *HXT7*); para esta construcción se utilizaron las endonucleasas *DraIII* y *NheI*. A continuación se da la mezcla de reacción de las digestiones: se utilizaron diferentes cantidades de ADN plasmídico dependiendo del ensayo, 2 µL de buffer 10X (cada enzima tiene su propio buffer), 2 µL de BSA (dependiendo de la enzima), 10 – 20 U de enzima y el agua necesaria para llevar a un volumen de 20 µL.

### 5.8. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

La purificación del ADN plasmídico se fundamenta en la desnaturalización en medio básico y en la renaturalización rápida; el ADN plasmídico como es pequeño y circular

sus cadenas de ADN están próximas, lo que permite que se renaturalicen apropiadamente y éste permanezca en disolución; en tanto el ADN cromosomal al ser más grande, su renaturalización no es eficiente por lo que es removido de la suspensión mediante centrifugación (Sánchez, 2011).

Las colonias que resultaron positivas a la transformación, se inocularon y se incubaron en medio líquido LB ampicilina (ver apéndice) (100 µg/mL) durante toda la noche a 37°C en agitación; posteriormente se centrifugan las células a 3500 rpm durante 5 min. Para la purificación del plásmido se utiliza el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). La purificación comienza con la resuspensión del pellet con la solución Cell Resuspension Solution (solución isotónica: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNasa A) posteriormente se rompen las bacterias y se desnaturaliza el ADN con la solución Lysis Solution (0.2 mM NaOH y 1 % SDS) y se tratan con Alkaline Protease Solution para inactivar las nucleasas. La renaturalización rápida se da con la Neutralization Solution (4.1 M clorhidrato de guanidina, 0.8 M acetato de potasio, 2.1 M ácido acético glacial) permitiendo que el ADN plasmídico se encuentre en disolución, se centrifuga y el sobrenadante se hace pasar en una columna de sílica, los lavados y la elución se realizaron con 750 µL y 250 µL de la solución Wash Solution (Etanol 95 %) y 100 µL de Nuclease Free Water respectivamente.

#### 5.9. DESFOSFORILACIÓN DE ADN

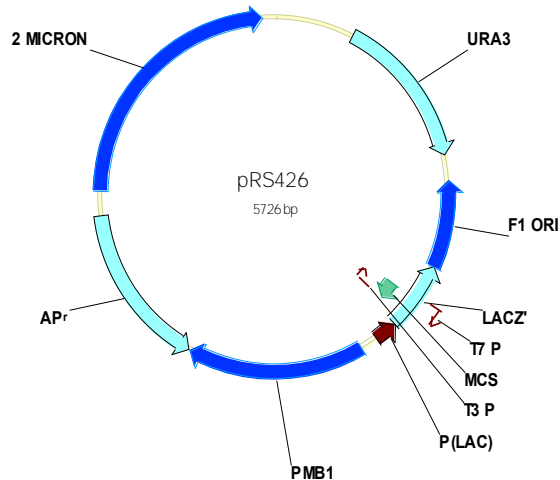
La desfosforilación se utilizó para evitar la recircularización de plásmidos que tienen extremos cohesivos de la misma naturaleza. Se utiliza fosfatasa alcalina de camarón (SAP “Shrimp alkaline phosphatase” de Fermentas). Esta enzima cataliza la

hidrólisis del grupo fosfato en el extremo 5' de ADN, ARN y dNTP's. La mezcla de reacción contiene 300 ng de vector, 2 µL de buffer SAP 10X, 1 U de SAP y agua necesaria para obtener un volumen de 20 µL. Se incubó durante 30 min a 37°C y posteriormente 65°C 15 minutos para inactivar a la enzima.

#### 5.10. CLONACIÓN EN EL VECTOR EPISOMAL PARA LEVADURA *pRS426*

Una vez obtenida la construcción promotor *HXT1*, marco de lectura *SpHXK2*, terminador *HXT7* en el plásmido *pJET1.2*, se realizó una digestión con las endonucleasas *XhoI* y *NotI* en el plásmido recombinante que tiene el heterogén y también en el plásmido *pRS426* (figura 7) con el fin de formar extremos cohesivos.

Para la ligación se utilizó: 2 µL de reaction buffer 10X, 30 ng del plásmido *pRS426*, 30 ng de inserto, agua libre de nucleasas necesaria para llegar a un volumen de 20 µL, y 5 U de *T4 DNA* ligasa. Posteriormente a la transformación de células competentes de *E. coli Top 10* se realizaron digestiones confirmativas para comprobar que el heterogén de la hexocinasa de *S. pombe* se clonó con éxito en el plásmido multicopia para levaduras *pRS426*; al plásmido resultante se le denominó *pCH1*. Finalmente para la obtención del plásmido que codifica para la hexocinasa de *S. pombe* y el transportador de hexosas *HXT1* se realizó una digestión en el plásmido *pCH1* y en el plásmido *pCHXT1* con la endonucleasa *NotI*; esta endonucleasa abre el plásmido *pCH1* y saca al gen *HXT1* del plásmido *pCHXT1* (figura 5B) formando extremos cohesivos, con lo que se hizo la ligación. Al plásmido resultante se le dio el nombre de *pCH2* (figura 9, página 35) el cual se mandó a secuenciar a la unidad de biología molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.



**Figura 7.** Plásmido multicopia para levadura *pRS426*. Sus características son: origen de replicación para levadura (*2 MICRON*), origen de replicación en *E. coli* (*PMB1*), origen de replicación en virus (*F1 ORI*), gen reportero para levaduras que son auxotrofas a uracilo (*URA3*), gen de resistencia a ampicilina (*AP<sup>r</sup>*), gen que codifica para una beta galactosidasa (*LACZ'*), sitio de clonación múltiple (*MCS*) y promotores para procariontes (*P (LAC)*, *T3 P* y *T7 P*)

### 5.11. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS

Se tomó una colonia de la cepa de levadura a transformar y se incubó a 30 °C en 50 mL de medio YPD (ver apéndice) en condiciones aerobias y en agitación durante la noche. Al siguiente día se inoculó en 50 mL de medio fresco YPD a una densidad óptica (DO) de 0.2 a 600 nm y se inculó a 30 °C hasta que la levadura se duplicó dos veces ( $DO_{600nm} = 0.8$ ), los siguientes pasos se realizaron en condiciones asépticas. Se centrifugó el medio a 3000 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 40 mL de agua estéril. Posteriormente se centrifugó de nuevo a 3000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de TE/LiOAc (AcLi 0.1 M, 10 mM Tris HCl pH 7.5 y 1 mM EDTA pH 8, la mezcla se esterilizó por filtrado) recién

preparado y se pasaron las células a un microtubo estéril. Después se centrifugó el microtubo durante 10 segundos a 14000 rpm y se desechó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de TE/LiOAc. Consecutivamente se tomaron 50  $\mu$ L de células y se colocaron en un microtubo estéril al cual se le adicionó 10  $\mu$ L de ADN de esperma de salmón (10 mg/mL) previamente hervido e incubado 5 minutos en hielo y 7  $\mu$ L de ADN plasmídico. Como controles del experimento, a una muestra no se le adicionó ADN plasmídico y a otra no se le adicionó ADN acarreador de salmón ni ADN plasmídico. A cada mezcla se le adicionó 300  $\mu$ L de PEG/TELiOAc (PEG 3350 al 45 %, AcLi 0.1 M, 10 mM Tris HCl pH 7.5 y 1 mM EDTA pH 8, la mezcla se esterilizó por filtrado) recién preparado y se mezcló con pipeta estéril. La mezcla se incubó 30 minutos a 30 °C, consecutivamente se sometieron a choque térmico a 42 °C durante 15 minutos invirtiendo los tubos cada 3 minutos. Finalmente se centrifugaron los microtubos a 14000 rpm durante 10 segundos, se eliminó el exceso de reactivos y se resuspendió con punta para plaquiar en medio mínimo (MMHML, ver apéndice). Cada cepa transformada (tabla 3) se incubó a 30 °C durante 3 días para su posterior análisis.



**Tabla 3.** Descripciones de las cepas utilizadas.

<b>Cepa</b>	<b>Plásmido</b>	<b>Características</b>
<b><i>Wt (BY4741)</i></b>	<i>pRS426</i>	Cepa tipo silvestre
<b><i>CH2 (BY4741)</i></b>	<i>pCH2</i>	Sobre-expresa los genes <i>SpHXK2</i> y <i>HXT1</i>
<b><i>Schxk2Δ (YO4620)</i></b>	<i>pRS426</i>	Se interrumpió el gen de la hexocinasa 2
<b><i>Schxk2Δ+pCH2 (YO4620)</i></b>	<i>pCH2</i>	Sobre-expresa los genes <i>SpHXK2</i> y <i>HXT1</i> , pero no expresa la hexocinasa 2 endógena

Las cepas son auxótrofas a histidina, metionina, uracilo y leucina. Los plásmidos contienen el gen *URA3* por lo que a los medios no se les adiciona uracilo para mantener la presión selectiva.

#### 5.12. HIBRIDACIÓN TIPO WESTERN BLOT

La expresión de la hexocinasa y el transportador de glucosa se determinaron por Western Blot. Las células usadas para la extracción de proteínas se disolvieron en buffer TU (tris-HCl 50 mM, urea 6 M, pH= 7) 100 mM con inhibidores de proteasa y 40 µg de proteína total, posteriormente las proteínas se separarán en un gel de SDS-PAGE al 12.5 % y se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham, UK). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con los diferentes anticuerpos policlonales o monoclonales en diferentes diluciones, las cuales de indican a continuación: HXKI, HXKII, HXKIII, HXKIV y GLUT-1 1:500 y beta-actina 1:10000 (Encor Biotechnology, Gainesville Florida). Las membranas se incubaron durante la noche a 4 ° C. Posteriormente se lavaron y las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario de cabra unido a peroxidasa de rábano, (dilución 1:2000 de HXKI y GLUT-1), ratón (dilución 1:2000 de HXKII) o conejo (dilución 1:2000 de HXKIII, HXKIV y 1:10.000 para la actina) (Santa Cruz, Biotechnology, CA) y se reveló en el

cuarto oscuro con quimioluminiscencia (Amersham Pharmacy, UK) con películas X-OMAT AR (Kodak, México). El análisis densitométrico se realizó utilizando el software Scion Image (Scion Corporation, Federico, MD, EE.UU.) y las densitometrías se normalizaron en contra de su control de carga respectivo, que corresponde al 100% de intensidad.

### 5.13. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PARA ENSAYOS DE ACTIVIDAD

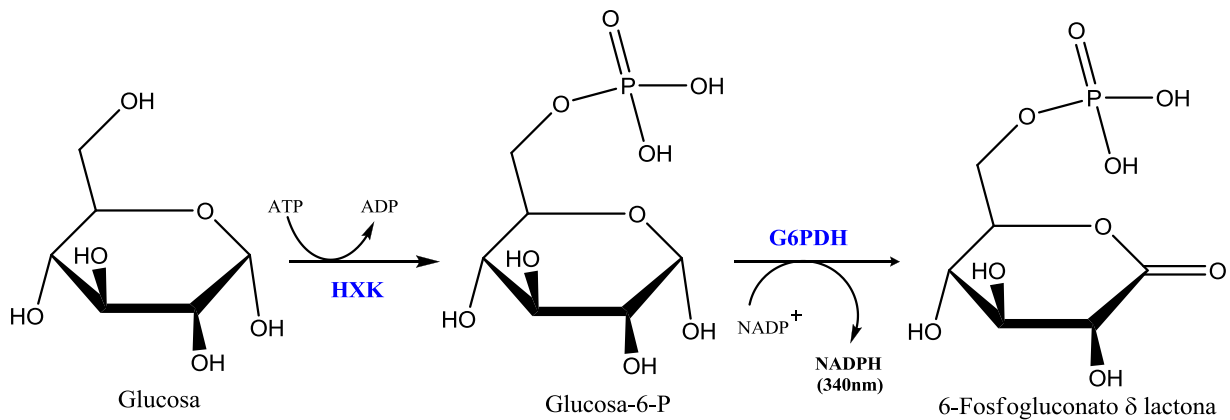
Se tomó una colonia de la cepa a evaluar y se incubó a 30 °C en 50 mL de medio MMHML en condiciones aerobias y en agitación durante la noche. Al siguiente día se inoculó en 50 mL de medio fresco MMHML a una densidad óptica (DO) de 0.2 y se incubó a 30 °C hasta que la levadura se duplicó dos veces (DO = 0.8) en condiciones anaerobias, los siguientes pasos se realizaron en hielo. Se centrifugó el medio a 3000 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 25 mL de agua fría para lavar las células. Posteriormente se centrifugó de nuevo a 3000 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de buffer lisis (1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 1 mM de EDTA, 50 mM de hepes pH= 7.5) y se pasaron las células a un microtubo. Después se centrifugó el microtubo durante 10 segundos a 14000 rpm y se desechó el sobrenadante.

Consecutivamente se determinó el peso del pellet celular y se adicionaron los  $\mu$ L de buffer de lisis equivalentes a los mg del pellet y se resuspendió con punta. Para romper las células por trabajo mecánico se le adicionaron perlas equivalentes a un volumen de 200  $\mu$ L. El contenido se mezcló con vortex durante un minuto y posteriormente se metió en un baño hielo durante un minuto y así sucesivamente hasta completar 6 ciclos. Finalmente las células se centrifugaron a 14000 rpm durante

10 minutos (la centrifuga previamente se enfrió) y el sobrenadante se mantuvo en hielo, este extracto posteriormente se utilizó para medir la actividad de la hexocinasa.

#### 5.14. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE LA HEXOCINASA

La actividad enzimática de la hexocinasa se realizó mediante un ensayo acoplado con glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). El método para monitorear la actividad estuvo basado en el cambio de adsorción del  $\text{NADP}^+$  y del  $\text{NADPH}$ . El  $\text{NADPH}$  es una molécula que absorbe a 340 nm, mientras que el  $\text{NADP}^+$  no. Por lo tanto, la actividad de la hexocinasa se detectó como el incremento en la absorbancia a 340 nm, debido a que en la reacción catalizada por la G6PDH el  $\text{NADP}^+$  es convertido a su forma reducida, el  $\text{NADPH}$  (figura 8).



**Figura 8.** Reacciones acopladas para la determinación de la actividad de la hexocinasa. La hexocinasa (HXK) cataliza la reacción de glucosa a glucosa 6-fosfato con gasto de ATP, la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) toma la glucosa 6-fosfato y la convierte en 6-fosfogluconato  $\delta$  lactona, para oxidar la glucosa 6-fosfato la enzima G6PDH utiliza el  $\text{NADP}$  dando lugar al  $\text{NADPH}$  que absorbe a 340 nm.

La actividad de la hexocinasa se determinó en celdas de plástico, las concentraciones finales en 1 mL de reacción son las siguientes: 4.0 mM Glucosa, 0.9 mM ATP, 6.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM NADP<sup>+</sup>, 1.0 U G6PDH y la cantidad necesaria de buffer de reacción (40 mM HEPES pH = 7.5 y 140 mM KCl) para que el volumen fuera de 0.995 mL; posteriormente se dejó correr una reacción basal para asegurar que no hay reacciones parásitas y por último se adicionó 5 µL de extracto dilución 1:50 con lo que se obtuvo una pendiente de la recta de absorbancia con respecto al tiempo. Para calcular la actividad total de la hexocinasa se utilizó la siguiente ecuación.

$$Actividad\ específica = \frac{m \left( \frac{Abs}{min} \right) * Vol.\ ensayo\ (mL)}{\epsilon\ (M^{-1}cm^{-1}) * b\ (cm) * mg\ prote\ na} = mmol\ min^{-1}mg^{-1}$$

Donde:

m: es la pendiente de la recta ( $\Delta Abs/\Delta t$ ) en unidades de abs / min.

$\epsilon$ : es el coeficiente de extinción molecular para el NADPH,  $6.22 \times 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$ .

b: es la distancia de la celda, que corresponde a 1 cm.

V. ensayo: es el volumen total del ensayo.

mg proteína: es la cantidad de proteína en mg agregada a la celda, tomando en cuenta la concentración de proteína determinada por el método de Lowry y el factor de dilución del extracto.

## 5.15. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEINAS POR LOWRY

La determinación de proteínas se utilizó ampliamente para poder reportar la actividad específica de la hexocinasa y para hacer el cargado homogéneo de proteína en el gel

de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE). La determinación de proteínas por el método Lowry se realizó en dos pasos, el primero es cuando a los extractos celulares se les hizo reaccionar con cobre en disolución básica para formar un compuesto colorido por coordinación entre los nitrógenos de las proteínas con el ión metálico. En el segundo paso el reactivo de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato.fosfotungstato) se añadió para incrementar la cantidad de color desarrollado. El aumento en el color ocurre cuando el fosfomolibdato y fosfotungstato oxidan los grupos fenólicos de los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas, la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu produce una coloración azul que se leyó a 660 nm.

Para la determinación de proteínas se realizó una dilución 1:10 de la muestra a cuantificar, se repartió en alícuotas de 10, 15 y 20  $\mu\text{L}$  en tubos de ensayo y se llevaron a 100  $\mu\text{L}$  con agua. Paralelamente se realizó una curva patrón de concentraciones de BSA de 0, 20, 40, 60 y 80  $\mu\text{g}$  y se aforó con agua hasta 100  $\mu\text{L}$ . A todas las muestras se les agregó 1 mL de la mezcla de la solución A (2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.4 % NaOH, 0.16 % tartrato de Na-K, 1% SDS) y la solución B (4 %  $\text{CuSO}_4$ ) en una proporción 50:1. Las mezclas se agitaron y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Consecutivamente se les añadió 100  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:2, se homogeneizó la muestra y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, finalmente se toma la absorbancia a 660 nm.

#### 5.16. FERMENTACIONES

Se realizaron fermentaciones para comparar las capacidades fermentativas de la cepa recombinante contra la cepa silvestre.

Se tomaron 3 colonias de tipo silvestre *WT* y 3 recombinantes *CH2*, se preincubaron en matraces de 250 mL con 50 mL medio MMHML (ver apéndice) al 5 % de glucosa (para desregular la parte alta de la glucólisis se utilizó como fuente de carbono galactosa al 2 %) y se incubaron a 30 °C a 250 rpm durante toda la noche. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se inocularon en medio fresco en frascos de microaerofilia (frascos cerrados herméticamente con tapones de hule, llenos al 75 % de su capacidad), con y sin benzoato de sodio (0.7 mM) a una densidad óptica de 0.1 en 600 nm.

En la fermentación se tomaron muestras para medir la producción de etanol por cromatografía de gases (ver metodología), así también se tomó muestra para determinar biomasa (densidad óptica "D.O." a 600 nm) y construir la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* al graficar D.O. vs tiempo de fermentación. Se graficó el logaritmo natural D.O. a 600 nm vs tiempo de fermentación para determinar el parámetro de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) considerando las primeras 8 horas de la fermentación.

#### 5.17. CUANTIFICACIÓN DE ETANOL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

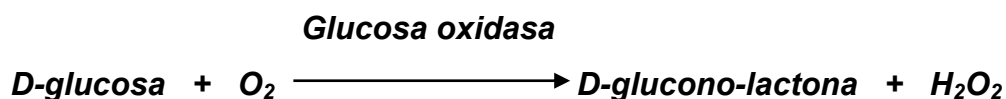
El equipo que se utilizó para la determinación de etanol fue un cromatógrafo de gases GC-2010 SHIMADZU. Se utilizó una columna HP-PLOT/U de una longitud de 30 m, 10  $\mu$ m de espesor de la membrana y un diámetro interno de 0.32 mm. El software utilizado fue GC solution. El tiempo de análisis fue de 15 minutos, a una temperatura de inyector de 180 °C y el modo de inyección fue de Split, con un ratio de Split de 20. El gas acarreador fue helio y el modo del control de flujo fue mediante presión. La presión fue de 75 kPa, el flujo total de 89.9 mL/min, el flujo de la columna 0.86 mL/min

la velocidad lineal 26.2 cm/s y el flujo de purga 3 mL/min. Temperatura del detector FID de 200 °C.

Se tomaron muestras en las fermentaciones en el tiempo inicial, a las 8 horas, a las 24 horas, a las 32 horas y así sucesivamente. Las alícuotas que se tomaron de las fermentaciones fueron de 0.5 mL, las cuales se colectaron en tubos de microfuga y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 1 minuto, se recuperaron los sobrenadantes, las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C. Para su posterior análisis las muestras se descongelaron al exponerlas a temperatura ambiente, se realizó una dilución 1:100 y se filtraron con una malla Millipore de 0.45 µm y se inyectaron 2 µL al cromatógrafo de gases.

#### 5.18. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE GLUCOSA EN LA FERMENTACIÓN

La glucosa fue cuantificada utilizando glucosa oxidasa y midiendo el consumo de oxígeno voltamperométricamente. La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa formando así peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y D-glucono-lactona.



El buffer utilizado en la reacción es acetato de sodio 50 mM pH = 5.1, el cual se burbujeó por aproximadamente 10 minutos para saturar completamente el sistema de oxígeno, así mismo se puso el baño a 25 °C. Para la reacción, se adicionó lo necesario de buffer de acetato burbujeado para que el volumen final de reacción fuera de 1700 µL, 2 U de glucosa oxidasa y 40 µL de la muestra dilución 1:10 o 1:100. Se realizó una curva estándar en la que se relacionó el oxígeno consumido con los

nanomoles de glucosa agregados de acuerdo a una solución de glucosa de referencia, la cual se cuantificó previamente por un ensayo enzimático usando hexocinasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Hernández, 2012).

#### 5.19. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

La velocidad de producción de etanol se determinó en el rango de 8 a 24 horas de fermentación; para su determinación fue necesario calcular el etanol producido en este intervalo de tiempo, el número de células que lo produjeron expresadas en mg y la velocidad aparente de crecimiento ( $\mu^*$ ). La velocidad aparente de crecimiento se calculó de la misma manera que la velocidad específica de crecimiento, solamente que se toman en cuenta únicamente los datos de 8 y 24 horas de fermentación. La ecuación que se utilizó es la siguiente:

$$J = \frac{\Delta nmol EtOH}{\Delta cel (mg)} * \mu$$

Donde:

J: flujo.

$\Delta nmol EtOH$ : producción de etanol de 8 a 24 h expresado en nmol.

$\Delta cel (mg)$ : células que produjeron etanol de 8 a 24 h expresadas en mg.

$\mu^*$ : es la velocidad aparente de crecimiento expresada en  $h^{-1}$ .

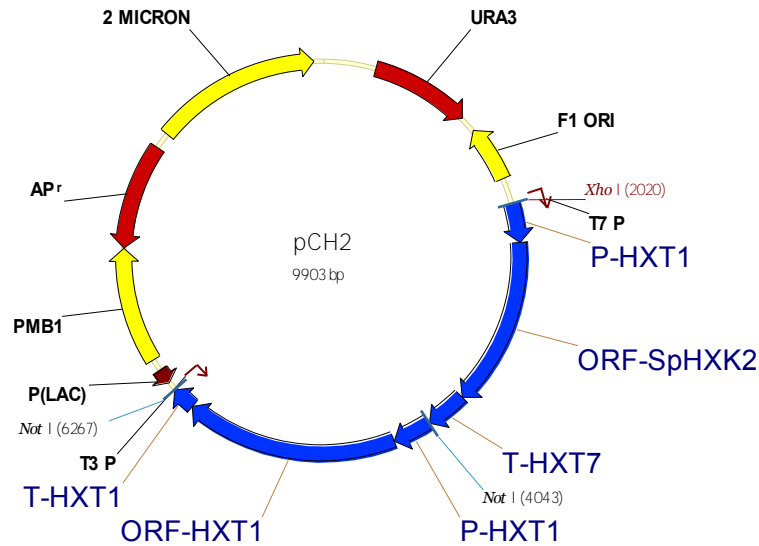


## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. CLONACIÓN DE LOS GENES *SpH XK2* Y *HXT1* EN EL PLÁSMIDO *pRS426*

Para que *Saccharomyces cerevisiae* exprese el gen de la hexocinasa 2 de *Schizosaccharomyces pombe* (*SpH XK2*), fue necesario unir la región codificante a una promotora que promueva altos niveles de transcripción. Se empleó el promotor del principal transportador de hexosas de *S. cerevisiae* (*HXT1*). Adicionalmente, al final de la región codificante se insertó una región terminadora de un gen de *S. cerevisiae*. La función de esta secuencia es proveer la señal de poliadenilación y de terminación de la transcripción. En este trabajo se dispuso de la región terminadora *HXT7*. Una vez que se obtuvo la construcción del gen heterólogo *SpH XK2*: promotor-marco de lectura abierto-terminador, se clonó en un plásmido multicopia específico para *S. cerevisiae* *pRS426*.

Al plásmido de levadura en el que se clonó el gen heterólogo de *SpH XK2* se le insertó la secuencia del transportador de baja afinidad *HXT1* de *Saccharomyces cerevisiae* (*ScHXT1*) el cual cuenta con su mismo promotor y terminador (figura 9). El plásmido resultante es llamado *pCH2*. Las transformantes resultantes sobreexpresaron simultáneamente una hexocinasa exógena insensible a trehalosa 6-fosfato y un transportador endógeno de baja afinidad el cual es altamente inducible a concentraciones mayores de 200 mM de glucosa. Tanto la hexocinasa como el transportador tienen el mismo tipo de promotor por lo que se asumió que responderían a las mismas señales de inducción y represión de la transcripción.

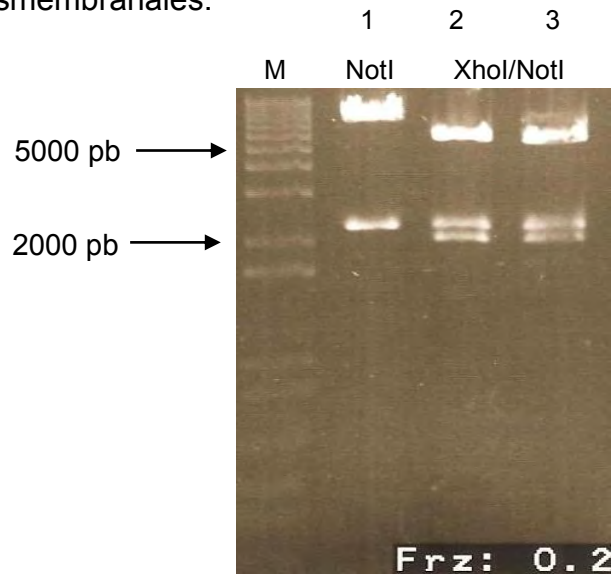


**Figura 9.** Vector episomal para levadura *pCH2*. En amarillo se muestran las secuencias de origen de replicación, en rojo los genes reporteros y en azul el gen heterólogo *SpHXK2* y adyacente a éste el gen *SchXT1*. Se muestran los sitios de corte de las endonucleasas *NotI* y *XhoI*.

Para confirmar que el vector recombinante tiene el inserto de la hexocinasa *SpHXK2* y el transportador *SchXT1* se efectuaron digestiones con enzimas de restricción tipo II (figura 10), se realizó la digestión con la endonucleasa *NotI* que extrae el gen del transportador. Al realizar la digestión con *NotI* y *XhoI* se obtienen el gen del transportador y el heterogén de la hexocinasa de 2224 y 2023 pb respectivamente (ver figura 9 para localizar los sitios de corte).

Se secuenciaron los dos insertos obteniéndose un 100 % de identidad para el marco de lectura abierto de la hexocinasa 2 de *S. pombe* y un 99.6 % de identidad para el transportador de hexosas *HXT1* de *S. cerevisiae*, en donde se encontraron dos cambios a nivel de amino ácidos. El primer cambio es de una arginina por una lisina (los dos aminoácidos son catiónicos), y el segundo cambio es una metionina por valina (ambos aminoácidos son no polares). Al pertenecer los aminoácidos al mismo

grupo que los originales es posible que dichos cambios no afecten la afinidad ni la velocidad de transporte. Los cambios se encuentran dentro de las asas y no en las regiones transmembranales.

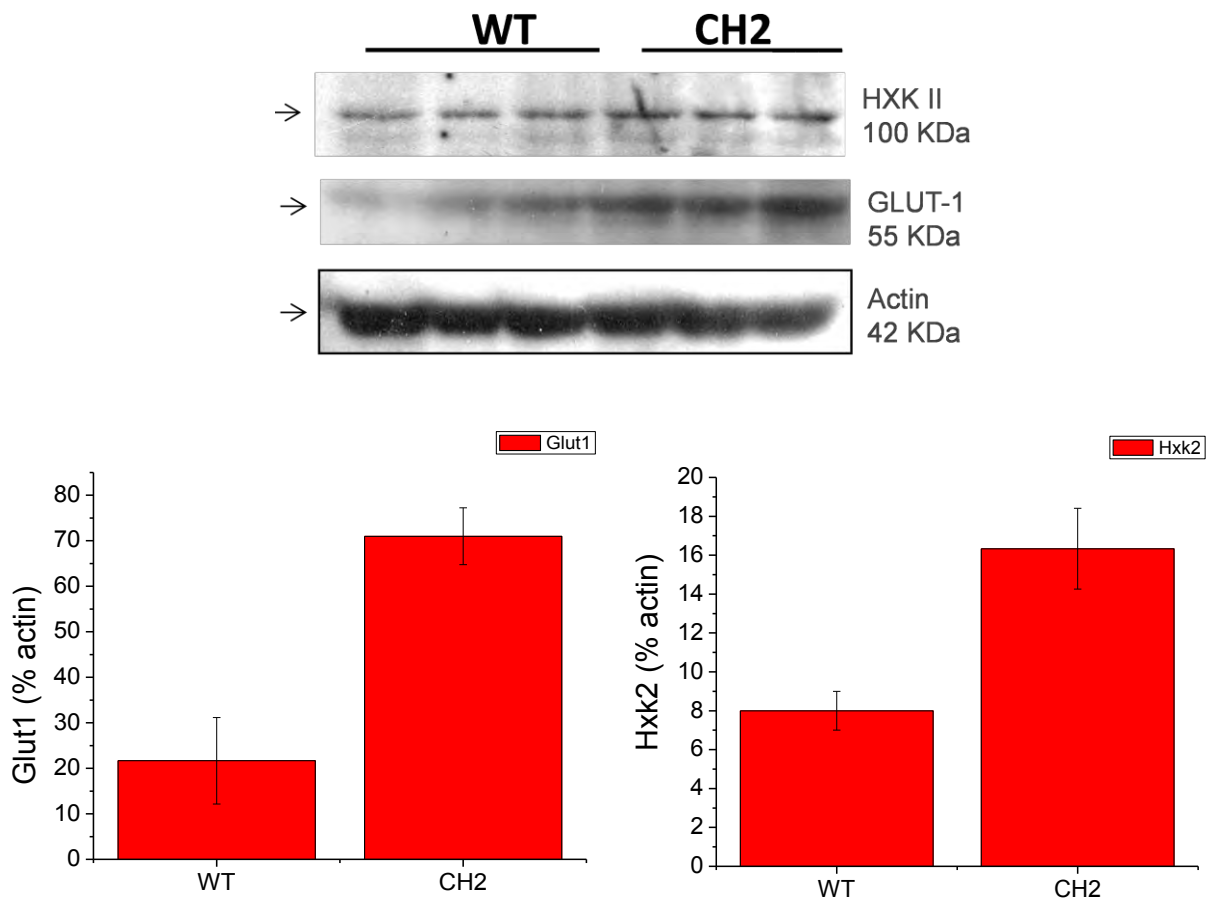


**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. El marcador (pozo M) de peso molecular utilizado fue el 1Kb ADN Plus Ladder (Invitrogen). En el carril 1 se muestra la digestión *NotI* donde se libera el gen *SchXT1* (2224 pb), en el pozo 2 y 3 se muestran los productos de la digestión con *NotI* y *XhoI* que son el gen *SchXT1* y el heterogén *SpHXK2* (2224 y 2023 pb correspondientes).

## 6.2. SOBRE-EXPRESIÓN DE LA HEXOCINASA Y EL TRANSPORTADOR

Posterior a la transformación de *S. cerevisiae* se evaluaron los niveles de sobre-expresión de la hexocinasa y del transportador de hexosas en la cepa recombinante *CH2* y en la cepa de tipo silvestre *WT* al realizar el western blot (figura 11). La cepa *WT* se transformó con un vector vacío, por lo cual expresó la hexocinasa *HXK2* y el transportador *HXT1* y *HXT3*, estos genes son endógenos de *S. cerevisiae* y se inducen a altos niveles de glucosa (> a 50 mM). La cepa recombinante *CH2* expresó las isoformas de la hexocinasa y el transportador antes mencionados, y además sobre-expresó la hexocinasa insensible a trehalosa 6-fosfato *SpHXK2* y el

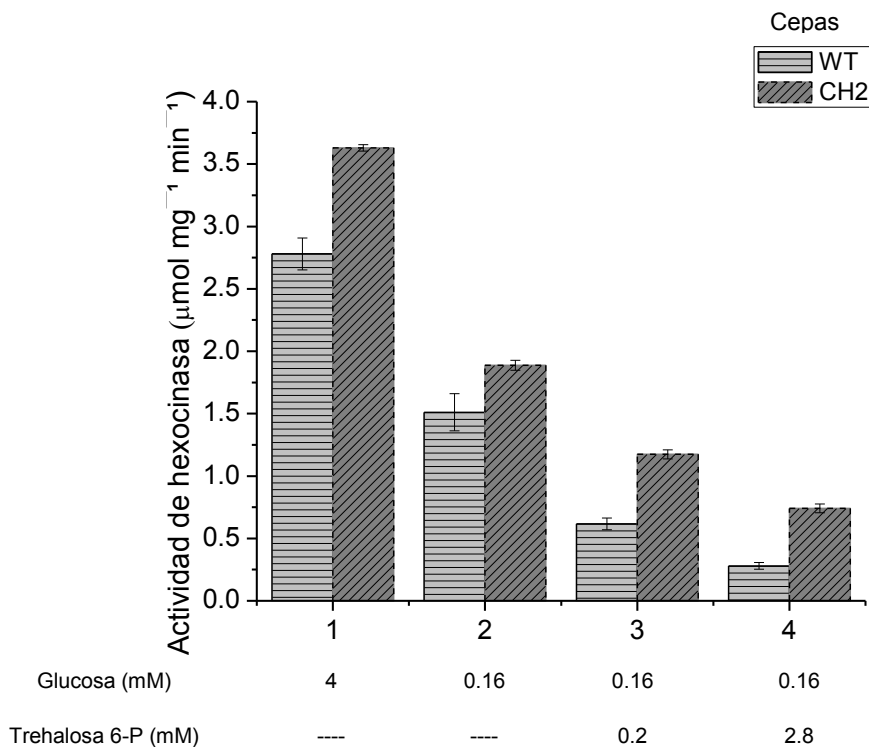
transportador *ScHXT1*. El análisis densitométrico permite dilucidar el aumento en la expresión tanto de la hexocinasa como del transportador en la cepa *CH2*, donde se tiene un aumento de 3.3 veces de sobre-expresión en el transportador *HXT1* y de 2 veces de sobre-expresión para la hexocinasa *HXK2*. Debido a que los dos genes que se desean sobre-expresar se encuentran regulados por el mismo tipo de promotor se especulaba que los niveles de sobre-expresión serian los mismos, sin embargo se tiene un menor aumento en la expresión de la hexocinasa 2.



**Figura 11.** Expresión de la hexocinasa 2 y el transportador de hexosas *Hxt1* por western blot. Las células se preincubaron en medio mínimo con 277.5 mM de glucosa inicial, posteriormente se inocularon en medio fresco y se cosecharon en fase exponencial. Para el análisis densitométrico se normalizó en contra de su control de carga de actina, que corresponde al 100 % de su intensidad. Este experimento se realizó por triplicado. En la gráfica de barras se muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar.

### 6.3. INCREMENTO EN LA ACTIVIDAD DE LA HEXOCINASA POR *SpHXK2*

Se esperaba que al sobre-expresarse dos veces la hexocinasa 2 se tuviera el doble de actividad enzimática, por lo que se realizaron ensayos enzimáticos, así mismo se determinó la sensibilidad de la hexocinasa 2 de *S. cerevisiae* y de *S. pombe* por trehalosa 6-fosfato (figura 12).

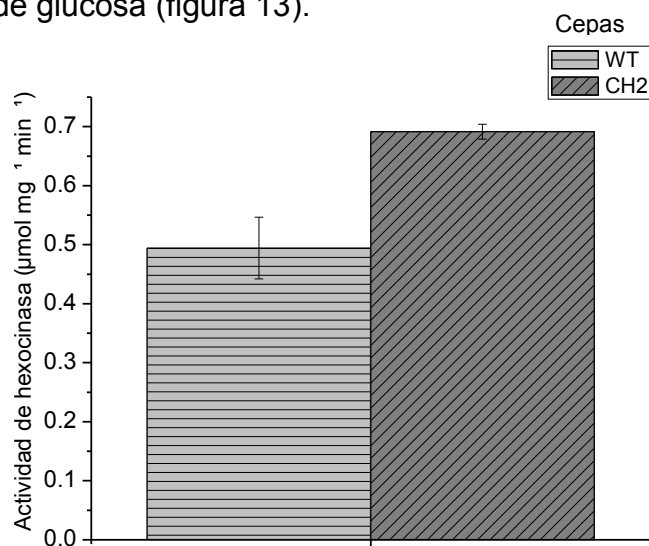


**Figura 12.** Actividad específica de la hexocinasa ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) sin y con la adición del inhibidor trehalosa 6-fosfato. Las células se preincubaron en medio mínimo con 277.5 mM de glucosa inicial, posteriormente se inocularon en medio fresco y se cosecharon en fase exponencial. Las actividades enzimáticas se determinaron en los extractos. La concentración de glucosa en el ensayo 1 es de 4 mM, en el ensayo 2, 3 y 4 la concentración de glucosa es de 0.16 mM (en el ensayo 1 y 2 no se adicionó trehalosa 6-fosfato), para el ensayo 3 la concentración de trehalosa 6-fosfato es de 0.2 mM y en el ensayo 4 la concentración de trehalosa 6-fosfato es de 2.8 mM. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado. Se muestran en las barras el promedio  $\pm$  desviación estándar.

Obsérvese en la figura 12 que en todos los ensayos enzimáticos la cepa *CH2* presenta una mayor actividad específica con respecto a la cepa *WT*, lo cual indica que la hexocinasa de *S. pombe* es funcional, sin embargo al medir la actividad en condiciones saturantes de sustratos (ensayo 1) no se observó el doble de actividad específica como se esperaba en la cepa *CH2*, en cambio se apreció un aumento en la actividad del 30 %, por lo que probablemente la hexocinasa de *S. pombe* tuvo cambios postraduccionales o tal vez no se pliega adecuadamente, originando que no toda la enzima presente sea activa. Los ensayos 2, 3, y 4 se realizaron a una concentración de glucosa cercana a la  $K_m$  de la hexocinasa de *S. pombe* y de *S. cerevisiae* ( $ScHxk2 K_{mGlc} = 0.14$  mM,  $SpHxk2 K_{mGlc} = 0.18$  mM), con el fin de observar la sensibilidad por el inhibidor trehalosa 6-fosfato que es un inhibidor del tipo competitivo ( $ScHxk2 K_i^{T6P} = 0.04$  mM), ya que a concentraciones saturantes de sustrato la inhibición por trehalosa 6-fosfato es despreciable. En el ensayo 2 no se adicionó trehalosa 6-fosfato y se obtuvo un aumento en la actividad de la cepa *CH2* con respecto a la cepa *WT* del 20 %, y al adicionar 0.2 mM de trehalosa 6-fosfato (concentración de trehalosa 6-fosfato citosólica en *S. cerevisiae*) el aumento en la actividad (*CH2* vs *WT*) es del 90 %, y al añadir 2.8 mM de trehalosa 6-fosfato el aumento en la actividad es del 170 %, por lo tanto al aumentar la concentración del inhibidor, el coeficiente de las actividades *CH2/WT* aumenta debido a que en la cepa *CH2* solo se afecta la hexocinasa 2 de *S. cerevisiae* por el inhibidor trehalosa 6-fosfato y la hexocinasa heteróloga no es inhibida. La sensible reducción en la actividad total al aumentar la concentración del inhibidor, indica que la mayor parte de la actividad es debido a la hexocinasa endógena. En la cepa recombinante *CH2* se perdió el 60 % de la actividad entre el ensayo 2 y 4, por lo tanto la hexocinasa de *S.*

*pombe* contribuyó a un 40 % en la actividad a una concentración de glucosa de 0.16 mM; por otra parte la cepa silvestre perdió el 83 % de la actividad, indicando que el inhibidor no es 100 % eficiente así que queda el 17 % de la actividad de la hexocinasa endógena; considerando lo anterior el 40 % que parecía ser la contribución de la hexocinasa recombinante en realidad es de 23 %.

Al medir la actividad específica a concentraciones citosólicas de glucosa, ATP y trehalosa 6-fosfato se tuvo un aumento en la actividad del 40 % en la cepa *CH2*, este aumento en la actividad se estimó que es el que presentan las células *in vivo* a altas concentraciones de glucosa (figura 13).



**Figura 13.** Actividad específica de la hexocinasa en condiciones fisiológicas ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ). Las células se preincubaron en medio mínimo con 277.5 mM de glucosa inicial, posteriormente se inocularon en medio fresco y se cosecharon en fase exponencial. Las actividades enzimáticas se determinaron en los extractos. La concentración de glucosa en el ensayo es de 0.8 mM, la concentración de ATP es de 2.5 mM y la concentración de trehalosa 6-fosfato es de 0.2 mM. El ensayo se realizó por triplicado. Se graficaron los promedios  $\pm$  desviación estándar.

#### 6.4. DESREGULACIÓN DE LA PARTE ALTA DE LA GLICÓLISIS

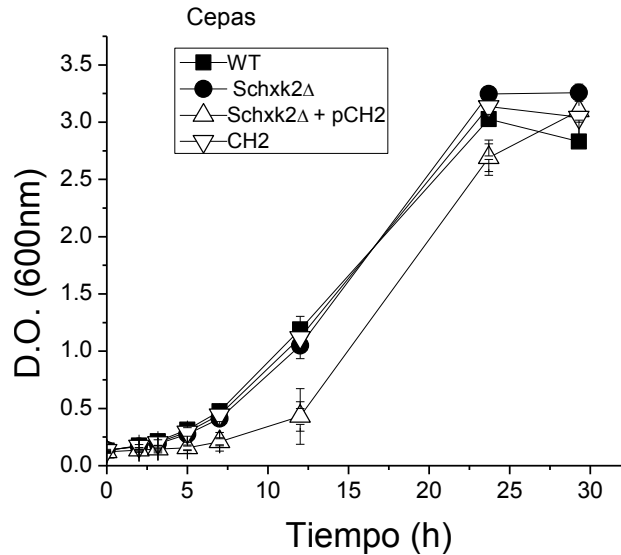
Con el fin de demostrar que la modificación genética realizada tiene importancia fisiológica se indujo a la célula a un cambio súbito en su metabolismo con el fin de desregular la parte inicial de la glicólisis originando un defecto en el crecimiento (figura 14). El cambio súbito en el metabolismo se puede dar cuando se cultiva a *S. cerevisiae* en galactosa y posteriormente se cultiva en un medio con glucosa, debido a que en un medio con galactosa se tiene un metabolismo fermento-respiratorio y al cultivarse posteriormente en medio microaerofílico con glucosa el metabolismo es predominantemente fermentativo. En estas condiciones de cambio de metabolismo el consumo de ATP en la parte alta de la glucólisis es mayor que la producción de ATP que se genera en la parte baja de la vía, esto provoca el agotamiento de ATP y como consecuencia la muerte celular en cepas en las que la hexocinasa no se inhibe eficientemente por trehalosa 6-fosfato (Bonini *et al*, 2003). Para evitar la muerte celular, la célula sintetiza trehalosa 6-fosfato que inhibe fuertemente a la hexocinasa 2 de *S. cerevisiae* y de este modo se va modulando la parte alta y así mismo se inducen las enzimas de la parte baja hasta que puede contender con la alta entrada de glucosa, el comportamiento mencionado es el que presenta la cepa de tipo silvestre *WT* en la figura 14.

Al sobre-expresar 3.3 veces el transportador de hexosas *Hxt1* y al aumentar un 23 % la actividad de hexocinasa insensible a trehalosa 6-fosfato *SpHxk2* en la cepa recombinante *CH2* se aumenta la velocidad de catálisis de la parte alta de la vía glucolítica, esta modificación en *Saccharomyces cerevisiae* es trascendente cuando ocurre un cambio súbito en el metabolismo, ya que se espera que tenga un defecto en el crecimiento, sin embargo la cepa *CH2* pudo contender ante este cambio (figura 14),



esto se atribuye a que el principal flujo de carbono de glucosa a glucosa 6-fosfato esta mediando principalmente por la *Hxk2* endógena de *S. cerevisiae* y no por la *Hxk2* de *S. pombe* insensible a trehalosa 6-fosfato.

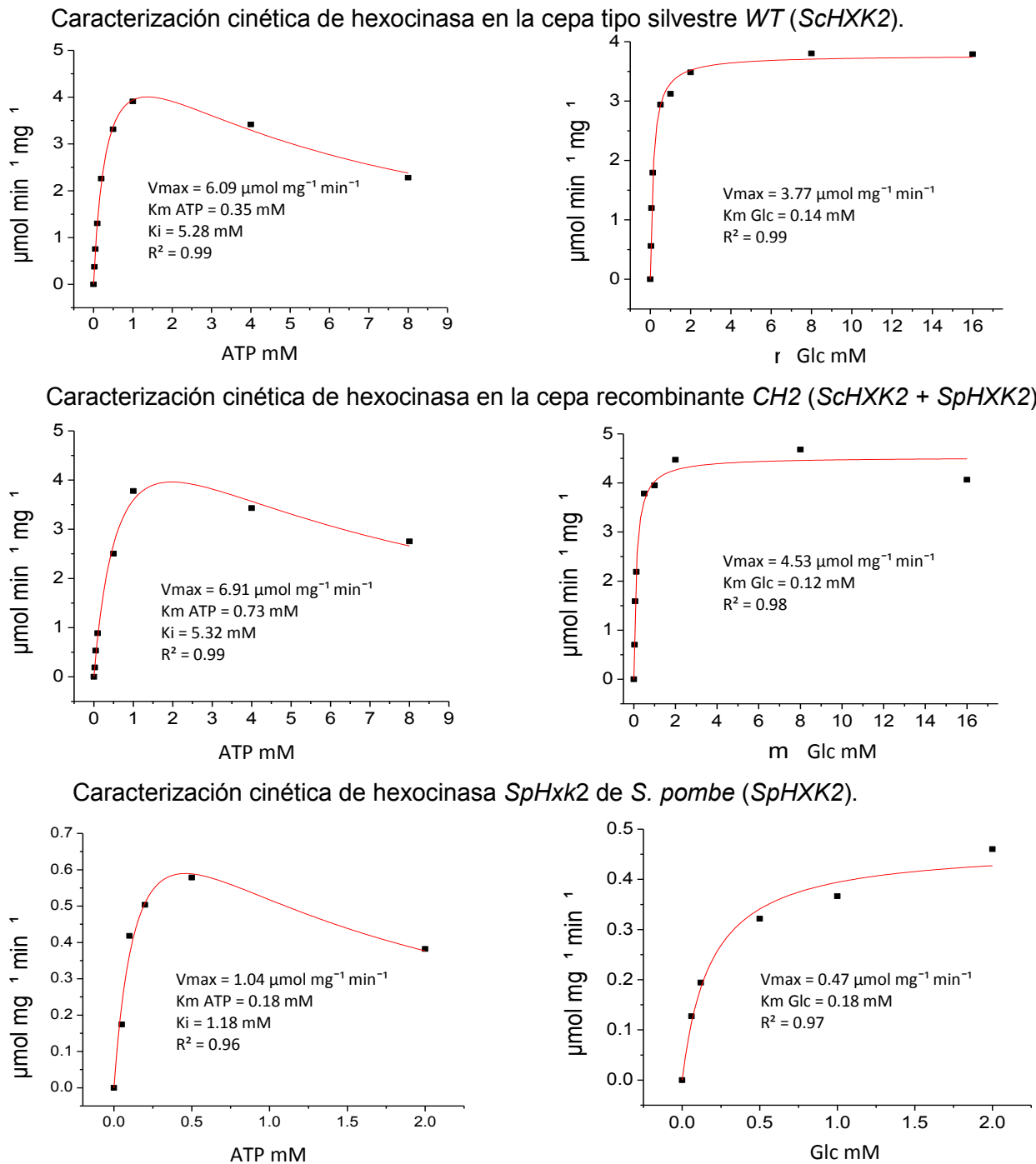
Las vías metabólicas ante un cambio redistribuyen el control del flujo para mantener la homeostasis con lo que la velocidad de crecimiento y en general la fisiología de una célula no se altera; para desequilibrar la homeostasis y disminuir el crecimiento, es necesario hacer varias modificaciones en el metabolismo de manera simultánea. Obsérvese que para modificar el crecimiento en *S. cerevisiae* fue necesario sobre-expresar el transportador *Hxt1* endógeno y la hexocinasa *Hxk2* de *S. pombe* en una cepa que tiene interrumpido el gen de la hexocinasa 2 (cepa *Schxk2Δ*). La cepa *Schxk2Δ* se transformo con el plásmido recombinante *pCH2* (cepa *Schxk2Δ* + *pCH2*). Al no tener hexocinasa 2 endógena la cepa *Schxk2Δ* + *pCH2* aseguramos que el flujo de carbono de glucosa a glucosa 6-fosfato se de en mayor grado por la hexocinasa 2 insensible a trehalosa 6-fosfato con lo cual es probable que bajaran los niveles de ATP y se ocasionara un crecimiento más lento en las primeras 12 horas (figura 14). De manera interesante la mutante *Schxk2Δ* pudo contender con el cambio súbito de fuente de carbono. Solamente en ausencia del gen endógeno de *Hxk2* y en presencia del gen heterólogo *SpHxk2*, así como la sobre-expresión del transportador *Hxt1* se afectó la vía glucolítica en *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figura 14.** Curva de crecimiento en medio líquido. Las cepas se preincubaron en medio mínimo con 110 mM de galactosa, posteriormente se inocularon en medio mínimo con 277.5 mM de glucosa inicial. El experimento se realizó por triplicado obteniéndose resultados consistentes.

#### 6.5. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA HEXOCINASA

Debido a que el principal flujo de glucosa a glucosa 6-fosfato esta mediado por la hexocinasa *Hxk2* de *S. cerevisiae* y no por la de *S. pombe* en la cepa *CH2*, se realizó la caracterización cinética de la hexocinasa en la cepa recombinante *CH2* (cepa que contenía los genes *SchHXK2* y *SpHXK2*) y en la tipo silvestre *WT* (con el gen endógeno *SchHXK2*), además se realizó la caracterización cinética de la hexocinasa de *S. pombe* en el extracto de la cepa *CH2* inhibiendo la hexocinasa endógena con trehalosa 6-fosfato (figura 15); así se determinaron las constantes cinéticas (tabla 4) que permitieron dilucidar que, tanto la hexocinasa insensible a trehalosa 6-fosfato de *S. pombe* como la hexocinasa de *S. cerevisiae*, tienen afinidades similares para sus sustratos (ATP y Glucosa) por lo que ambas pueden realizar su catálisis eficientemente, sin embargo no se pudo esclarecer a través de estos experimentos el porque la hexocinasa 2 de *S. pombe* no es la enzima predominante en la cepa *CH2*.



**Figura 15.** Caracterización cinética de la hexocinasa de la cepa *WT*, *CH2* y hexocinasa *SpHxk2* de *S. pombe*. Las células se preincubaron en medio mínimo con 277.5 mM de glucosa inicial, posteriormente se inocularon en medio fresco y se cosecharon en fase exponencial. Las actividades enzimáticas se determinaron en los extractos. Para la caracterización cinética de la hexocinasa de *S. pombe* se adicionó 2.8 mM de trehalosa 6-fosfato en el ensayo y se utilizó el extracto de la cepa *CH2*.

La limitada fosforilación de glucosa por parte de la hexocinasa heteróloga no se debió a la baja afinidad por los sustratos, ya que de acuerdo a los valores de  $K_m$  que se obtuvieron, la hexocinasa endógena como la heteróloga están saturadas de sustratos en las concentraciones citosólicas de ATP y glucosa (tabla 4). Posiblemente hay un mecanismo postraduccional que limita la actividad de la proteína *SpHxk2*.

Como se desconoce que mecanismos evitan la sobre-expresión de la hexocinasa de *S. pombe* a niveles mayores en la cepa *CH2* de *S. cerevisiae*, se sugiere sobre-expresar la glucocinasa 1 (*GLK1*) de *S. cerevisiae*, de la cual se ha reportado que no se inhibe por trehalosa 6-fosfato y además tiene una alta afinidad por glucosa ( $K_{m_{Glc}} = 0.05$  mM). Debido a que la glucocinasa se induce a bajas concentraciones de glucosa, se debería sustituir su promotor por otro que promueva su sobre-expresión a altas concentraciones de glucosa. Otra modificación con el fin de aumentar el flujo de glucosa a glucosa 6-fosfato es la sobre-expresión de la trehalosa 6-fosfato fosfatasa (*TPS2*); esta enzima cataliza la reacción de trehalosa 6-fosfato a trehalosa. Al sobre-expresarse el gen *TPS2* se disminuiría la concentración citosólica de trehalosa 6-fosfato, con lo que se disminuiría la inhibición de la hexocinasa endógena y no se reduciría la síntesis de trehalosa, ya que se ha observado que la limitación de trehalosa es mortal al deletar el gen *TPS1* (su transcrito codifica para la trehalosa 6-fosfato sintasa) en una cepa de *S. cerevisiae*.

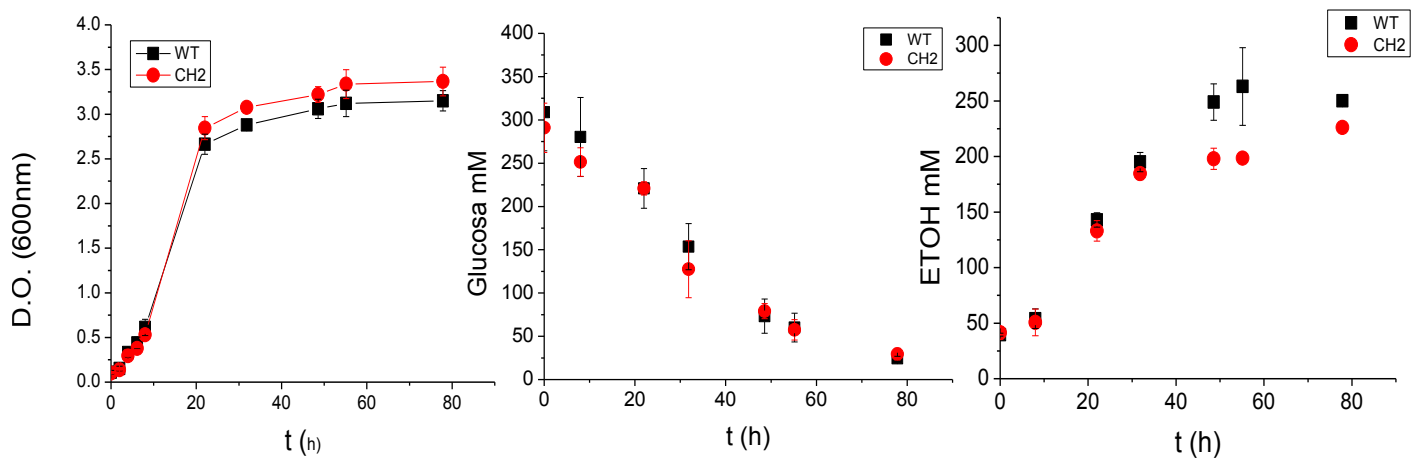
**Tablas 4.** Afinidades de la hexocinasa por sus sustratos, constantes de disociación de enzima-inhibidor y concentraciones citosolicas de sustratos e inhibidores.

	$*K_i^{T6P}$ (mM)	$*[T6P]$ (mM)	$Km_{Glc}$ (mM)	$*[Glc]$ (mM)	$Km_i^{ATP}$ (mM)	$Km_{ATP}$ (mM)	$*[ATP]$ (mM)
ScHXK2	0.04		0.14		5.28	0.35	
ScHXK2+SpHXK2		0.2	0.12	0.8	5.32	0.73	2.5
SpHXK2	>3		0.18		1.18	0.18	

\* Valores reportados.

## 6.6. FERMENTACIÓN ALCOHOLICA EN CONDICIONES MICROAEROFILICAS

Se determinó el consumo de glucosa y producción de etanol de la cepa *WT* y *CH2* a partir de cultivos microaerofilicos con el fin de evitar el metabolismo respiratorio en el medio mínimo con 277.5 mM de glucosa (figura 16). La cepa que sobre-expresa el transportador *HXT1* y la hexocinasa de *S. pombe* *SpHxk2* tiene la misma velocidad especifica de crecimiento que la cepa tipo silvestre ( $\mu_{CH2} = 0.21 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  y  $\mu_{WT} = 0.21 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ ), la tasa de producción de etanol y consumo de glucosa son similares en las dos cepas. A las 22 horas de incubación se detiene el crecimiento exponencial y la concentración de glucosa en el medio es de 221 mM para ambas cepas por lo que el promotor del transportador *HXT1* y el de la hexocinasa de *S. pombe* sigue siendo altamente inducible. Estos resultados confirman que la capacidad fermentativa de la cepa *CH2* que sobre-expresa al transportador *HXT1* y la hexocinasa 2 de *S. pombe* es igual a la tipo silvestre.



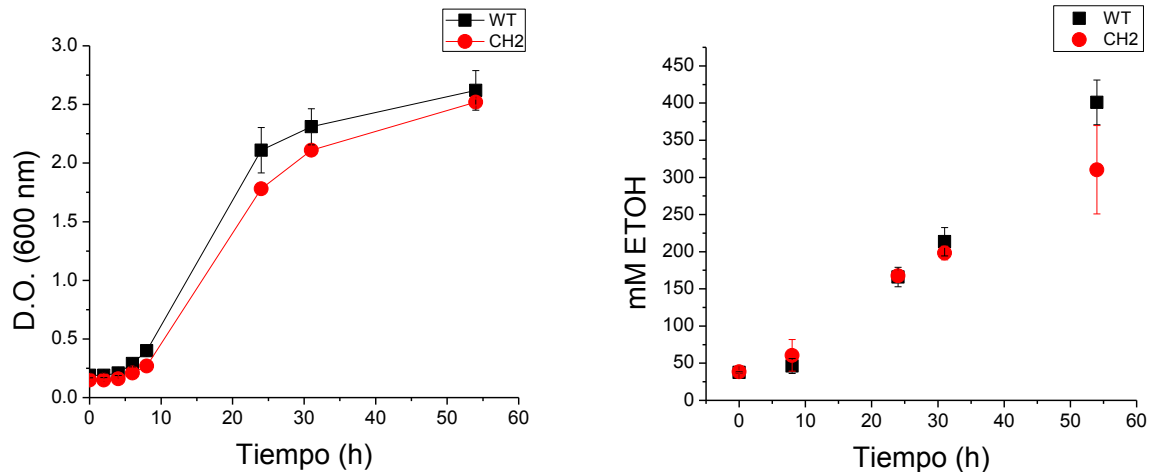
**Figura 16.** Curva de crecimiento, consumo de glucosa y producción de etanol de la cepa *CH2* y *WT*, las muestras se colectaron a diferentes tiempos en la fermentación. Las cepas se preincubaron en medio mínimo con 277.5 mM de glucosa, posteriormente se inocularon en medio mínimo con 277.5 mM de glucosa inicial. El experimento se realizó por triplicado obteniéndose resultados consistentes.

### 6.7. FERMENTACIÓN ALCOHOLICA CON BENZOATO DE SODIO

Al realizar la fermentación alcohólica en presencia de 0.7 mM de benzoato de sodio se aumenta la demanda de ATP debido a que una porción de éste entra a la célula como ácido benzoico y posteriormente se desprotona ocasionando estrés en la célula. Para contener ante la acumulación de protones intracelulares *S. cerevisiae* activa una ATPasa que se encuentra en la membrana celular, la cual al expulsar los protones hidroliza ATP provocando un aumento en la demanda de ATP (Kresnowati *et al*, 2008).

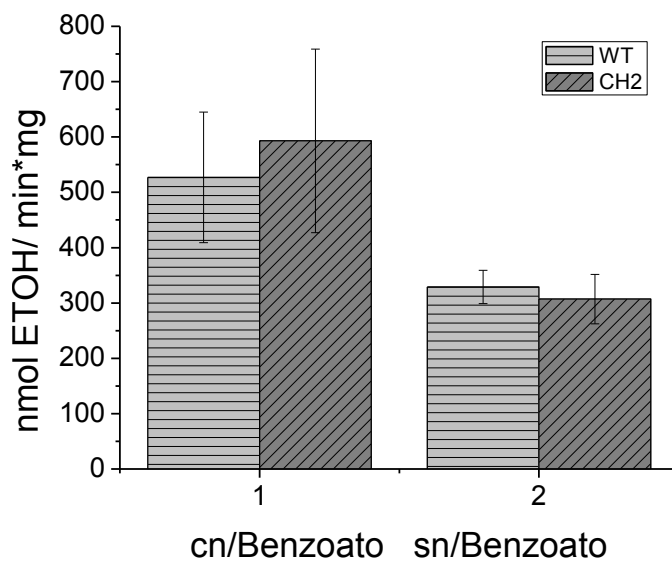
Se determinó la tasa de producción de etanol al aumentar la demanda de ATP en un medio microaerofílico con 277.5 mM de glucosa (figura 17). Al aumentar el requerimiento de ATP la velocidad específica de crecimiento de la cepa *CH2* y de la tipo silvestre disminuyen ( $\mu_{CH2} = 0.17 \pm 0.04$  y  $\mu_{WT} = 0.18 \pm 0.03$ ), así mismo también

disminuye la biomasa un 25 % con respecto a la fermentación sin benzoato cuando se llega a la fase estacionaria (datos del inciso 6.6) y se produce una mayor cantidad de etanol. Estos resultados indican que al aumentar la demanda de ATP, hay una mayor producción de etanol el cual es producido por un número menor de células.



**Figura 17.** Curva de crecimiento y producción de etanol de la cepa *CH2* y *WT*, al aumentar la demanda de ATP. Las cepas se preincubaron en medio mínimo con 277.5 mM de glucosa, posteriormente se inocularon en medio mínimo con 277.5 mM de glucosa inicial y 0.7 mM de benzoato de sodio pH = 5. El experimento se realizó por triplicado obteniéndose resultados consistentes.

En los experimentos realizados la demanda de ATP aumenta el flujo glucolítico de 1.6 a 1.9 veces (figura 18), se tienen reportes en donde se ha aumentado hasta 2 veces (Daran-Lapujade *et al*, 2007). Sin embargo no se ve un efecto sinérgico al aumentar los requerimientos de ATP en la cepa *CH2* que sobre-expresa el transportador *Hxt1* y la hexocinasa *SpHxk2*.



**Figura 18.** Velocidad de producción de etanol de la cepa *CH2* y *WT* en presencia y ausencia de benzoato de sodio en medios mínimos con 277.5 mM de glucosa a pH = 5. El experimento se realizó por triplicado obteniéndose resultados consistentes.

Es bien sabido que para modificar los flujos metabólicos son necesarios varios cambios simultáneos para sobrepasar la capacidad de regulación de la célula, sin embargo se ha visto que al aumentar solamente la demanda de ATP el flujo glucolítico aumenta, es probable que el control del flujo glucolítico recaiga predominantemente en la demanda de ATP.



## 7. CONCLUSIÓN

1. El aumento en la actividad de hexocinasa al expresar el gen heterólogo en un plásmido multicopia bajo el control de un promotor muy activo, fue tan solo del 40 % a las concentraciones citosólicas de sustratos y de inhibidor.
2. La capacidad fermentativa de la cepa que sobre-expresa simultáneamente el transportador *HXT1* y la hexocinasa *SpHXK2* de *S. pombe* es similar a la cepa tipo silvestre, por lo tanto no se aumentó la velocidad de producción de etanol.
3. Solamente al aumentar la demanda de ATP la velocidad de producción de etanol aumenta aunque de manera similar entre ambas cepas, la silvestre y la recombinante.

## 8. PERSPECTIVAS

Sobre-expresar la glucocinasa 1 (*GLK1*) de *S. cerevisiae* bajo el control de un promotor que promueva su expresión a altas concentraciones de glucosa para obtener mayor actividad fosforilante de glucosa.

Sobre-expresar la trehalosa 6-fosfato fosfatasa (*TPS2*) para disminuir la concentración citosólica de trehalosa 6-fosfato y disminuir la inhibición de las hexocinasas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Arcos, D., 2011. *Estudio bioquímico del efecto de la modificación simultanea de la demanda de ATP y de la inhibición de la hexocinasa (HXK2) sobre la velocidad de producción d etanol en Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de licenciatura. FQ, UNAM. México.

Balat, M., Balat H., Öz, C., 2008. Progress in bioethanol. *Processing in Energy and Combustion Science*. 34(5), 551-573

Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabanas, A., Manzanateres, P., Ballesteros, M., 2006. Etanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 130, 496-500.

Blázquez, M. A., Lagunas, R., Gancedo, C., Gancedo, JM., 1993. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *Federation of European Biochemical Societies*, 329(1.2), 51-54.

Blázquez, M. A., Stucka, R., Feldmann, H., Gancedo, C., 1994. Trehalose-6-P synthase is dispensable for growth on glucose but not for spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Bacteriology*, 176 (13), 3895-3902.

Barnett J. A., Payne R. W. and Yarrow D., 1990. Yeasts: Characteristics and Identification, 2nd edn., *Cambridge University Press, Cambridge*.

Boles E., Hollenberg C. P. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *Federation of European Microbiological Societies*. Rev. 21: 85-111.

Bonini B., Van Dijck P., Trevelein J., 2003. Uncoupling of the glucose growth defect and the deregulation of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* *tps1* mutants expressing trehalosa 6-phosphate insensitive hexokinase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica et Biophysica*. 1606, 83-93.

Camps, M. & Marcos M.F., 2008. *Los biocombustibles*. 2a Ed. Madrid: Mundi-Prensa.

Comisión Europea., 2001. *Libro verde - Hacia una estrategia europea de seguridad del abastecimiento energético*. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas

Daran-Lapujade P., Rossell S., van Gulik W. M., Luttik M. A., de Groot M. J., Slijper M., Heck A. J., Daran J. M., de Winde J. H., Westerhoff H. V., Pronk J. T., Bakker B. M., 2007. The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 104 (40), 15753-8.

Díaz, J.C., Juárez, M.A. 2007. Glucólisis. **En:** F. Acosta ed. *BIOQUÍMICA: Un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida*. Ciudad de México: McGraw-Hill, capítulo 11.

Dickinson J. R., 1999. Carbon metabolism. **En:** *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*. (Dickinson, J. R. and Schweizer, M., eds), 23–55, Taylor and Francis, London.

Elbing K., Larsson C., Bill R. M., *et al.* 2004. Role of Hexose Transport in Control of Glycolytic Flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (9). 5323–5330.

GeneDB, 2011. *Schizosaccharomyces pombe* GeneDB. [En línea] (Actualizado el 28 de noviembre del 2011). Disponible en: <http://old.genedb.org/genedb/pombe/> [Último acceso 1 de diciembre del 2011]

Hauf J. Zimmermann F.K., Muller S., 2000. Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 26 (9-10). 688-698.

Hernández S., 2012. Influencia del transporte de glucosa y la demanda de ATP, sobre la velocidad de producción de etanol en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de licenciatura. FQ, UNAM. México.

Hohmann S. & Mager W., 1997. The responses of yeast to osmotic stress. *Yeast stress responses*. S. Hohmann and W. Mager. U.S.A., Chapman & Hall: 101-146.

Kresnowati M. T., Van Winden W. A., Heijnen J. J., 2008. Energetic and metabolic transient response of *Saccharomyces cerevisiae* to benzoic acid. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 275: 5527-5541.

Lagunas, R. 1993. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies. Rev.* 104, 229 – 242 .

Larsson C., Pahlman I. L. Gustafsson L. 2000. The importance of ATP as a regulator of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 16 (9). 797-809.

Reifenberger, E. , Freidel, K. and Ciriacy, M. ( 1995 ) Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux . *Molecular Microbiology*. 16, 157 – 167.

Reijenga K. A., Snoep J. L., Diderich J. A., van Verseveld H. W., Westerhoff H. V., Teusink B., 2001. Control of Glycolytic Dynamics by Hexose Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biophysical Journal*. (60) 626–634

Oligo Calc. 2011. Oligonucleotide Properties Calculator. [En línea] (Actualizado en el 2010). Disponible en: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/> [Último acceso 1 de diciembre del 2011]

Sánchez, S., 2011. *Manual de prácticas de bioquímica experimental (0141)*. Ciudad de México: Dpto de Bioquímica Experimental FQ UNAM.

Schaaff I., Heinisch J., Zimmermann F. K., 1989. Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast*. 5 (4). 285-290.

Scragg, A. 2001. Energía y biocombustibles. **En:** Longman ed. Biotecnología medioambiental. Zaragoza: ACRIBIA, capítulo 6.

SGD. 2011. *Saccharomyces Genome Database*. [En línea] (Actualizado en noviembre del 2011). Disponible en: <http://yeastgenome.org/> [Último acceso 1 de diciembre del 2011]

Strachan, T., Read, A., 2006. Amplificación del DNA: clonación de DNA por PCR y basada en células. **En:** A. Bravo ed. *Génética Humana*. New York: 3<sup>rd</sup>, capítulo 5.

Weusthuis R. A., Pronk J. T., van den Broek P. J. A. and van Dijken J. P., 1994. Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeast. *Microbiology Rev.* 5, 616 – 630.

## 10. APÉNDICE

<b>Medio LB para bacterias</b>	<b>1 L</b>
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
Ampicilina stock(25 mg/mL)	1 mL

<b>Medio YPD para levaduras</b>	<b>1 L</b>
Extracto de levadura	10 g
Peptona de caseína	20 g
Dextrosa anhidrida	20 g
Agar	20 g

<b>Medio mínimo para levaduras (MMHML)</b>	<b>1 L</b>
Stock de vitaminas*	1000 µL
Stock de trazas**	1000 µL
Stock de sales***	20 mL
Glucosa	20 g
Sulfato de amonio	5 g
Agar	25 g

Al medio se le adiciona Histidina, Metionina y Leucina y ya que las cepas utilizadas son auxotrofas a estos amino ácidos.

<b>Amino ácido</b>	<b>Concentración en el medio g/L</b>
Histidina	0,02
Metionina	0,02
Leucina	0,1

<b>*Stock de Vitaminas</b>	<b>(1000 x)</b>
Biotina	2 mg
Pantotenato de calcio	400 mg
Ácido fólico	2 mg
Niacina	400 mg
Ácido p-amino benzoico	200 mg
Piridoxina	400 mg
Riboflavina	200 mg
Tiamina-HCl	400 mg
Inositol	200 mg
H <sub>2</sub> O	1000 mL

<b>**Stock de Trazas</b>	<b>(1000 x)</b>
Ácido Bórico	500 mg
Sulfato cúprico	40 mg
Ioduro de potasio	100 mg
Cloruro férrico	200 mg
Sulfato de magnesio	400 mg
Molibdato de sodio	200 mg
Sulfato de zinc	400 mg
H <sub>2</sub> O	1000 mL

<b>***Stock de Sales</b>	
Fosfato monobásico de potasio	50 g
Sulfato de magnesio	5 g
Cloruro de sodio	1 g
Cloruro de calcio	1 g
H <sub>2</sub> O	1000 mL
Cloroformo	5 mL