

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DEL TRANSPORTADOR DE XILOSA EN *Debaryomyces hansenii*

Eric Juárez Saldaña¹, Gustavo Alberto de la Riva de la Riva

RESUMEN

El xilitol es un alcohol de 5 C, es un edulcorante no calórico que proporciona efectos benéficos a la salud, es obtenido por la reducción química del azúcar D-xilosa por hidrogenación. Una forma alternativa de su producción química la utilización de levaduras altamente productoras de polioles del género *Debaryomyces* y *Candida*. Aplicando ingeniería genética buscamos obtener cepas de *Sacharomices cerevisiae* capaces de usar xilosa como fuente de carbono. En nuestro proyecto hemos amplificado por PCR y clonado los genes involucrados en el transporte de xilosa a partir de *D. hansenii* para posteriormente proveerlos a cepas altamente eficientes en la producción de etanol de *S. cerevisiae*, aisladas de la industria mezcalera, para valorar su comportamiento y capacidad fermentativa en medios ricos en xilosa.

PALABRAS CLAVE

xilitol, levadura, transportador

INTRODUCCION

La producción de etanol y xilitol mediante procesos fermentativos constituyen un importante campo de interés en la investigación y desarrollo de la biotecnología industrial. Actualmente, existen procesos fermentativos que se utilizan para convertir los residuos de los productos primarios forestales en subproductos industriales como etanol y xilitol entre otros muchos. En un esfuerzo por mejorar este tipo de proceso se han creado y experimentalmente utilizado cepas de *S. cerevisiae* genéticamente modificadas. Estas tentativas no han resultado en procesos más eficientes porque *S. cerevisiae* es una cepa excelente en la fermentación de hexosas, pero totalmente incapaz de fermentar las pentosas. Las enzimas de otros organismos involucradas en el metabolismo de xilitol se han expresado en esta levadura, pero los transportadores para los sustratos y los productos finales todavía no se han expresado y estudiado. El xilitol es un producto secundario principal en la producción del etanol de subproductos lignocelulósicos de amplia utilización en las industrias alimentarias y farmacéuticas, no es cariogénico, sustituto del azúcar para los diabéticos tipo II, y como edulcorante (Makinen, 1992). El xilitol, a escala industrial, se obtiene por una reducción catalítica (hidrogenación) de la xilosa, obtenida a partir de fuentes de madera tales como abedules blancos. *Cándida intermedia* ha sido reportada (Leandro et al; 2006) como una levadura con la capacidad de crecer en medios ricos en xilosa y transportar esta pentosa por dos sistemas de transporte diferentes uno de alta afinidad; en el cual, se realiza con un simporte de H⁺, también se tiene un sistema de baja afinidad que se da por difusión facilitada; ambos sistemas utilizan glucosa como sustrato. *D. hansenii* ha sido descrita como una levadura halofílica-halotolerante (González-Hernández, J. C. y col., 2004, 2005), ésta puede metabolizar D-xilosa en xilitol (Barbosa et al., 1988; Gírio y col., 2000). El presente proyecto versa la caracterización molecular y bioquímica del transporte y metabolismo de xilosa en *D. hansenii*, identificar los genes implicados en este proceso (*GXF1*, *GXS1*, *XR*) y los sistemas de transporte y metabolismo de xilosa en *D. hansenii* y proponer esta tecnología para la producción de xilitol. La enzima xilosa reductasa (*XR*) es responsable del primer paso en el metabolismo de la xilosa en levaduras. En una reacción catalizada por esta enzima, la xilosa es reducida a xilitol que puede ser oxidado a xilulosa por la enzima xilitol deshidrogenasa (*XDH*) ó puede ser liberado al ambiente, dependiendo de las condiciones del medio de cultivo y los microorganismos (Kern y col., 1997; Ho y col., 1998).

MATERIALES Y METODOS

Cepas de levaduras y condiciones de cultivo. En este trabajo se utilizaron 4 cepas de levaduras que fueron provistas por el instituto tecnológico de Morelia (ITM): *Cándida magnoliae*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A Ura- y *Saccharomyces cerevisiae* ITM-2014. Las cepas se crecieron en medio YPD (Extracto de Levadura, Peptona y Glucosa 2%) o YPX (Extracto de Levadura, peptona y xilosa 2%) a una temperatura de 28°C con agitación a 110 rpm.

Cinética de crecimiento en medios YPD y YPX. Se realizó una cinética de crecimiento de las cuatro levaduras, con las que trabajaremos en este proyecto, con el fin de determinar su comportamiento tanto en usando en glucosa cómo usando xilosa en el medio de cultivo. Las levaduras se crecieron en lotes de 50 mL de medios YPD (Extracto de Levadura, Peptona y Glucosa 2%) y YPX (Extracto de Levadura, peptona y xilosa 2%) a 110 rpm y temperatura de 28°C. Se tomaron muestras durante 24 horas cada 2 horas y se midieron los parámetros de densidad óptica a 595 nm y pH (foto espectrómetro a luz visible), así cómo se determinó el número de células por mL de cultivo (sembrando diluciones cada 4 horas).posteriormente se

realizaron las curvas de crecimiento de cada levadura tomando en cuenta la densidad óptica y el tiempo de toma de muestra.

Extracción de DNA total de *D. hansenii*. Se optimizaron las condiciones de crecimiento de *Debaryomyces hansenii* y probamos diferentes medios ricos siendo el medio YPD el más adecuado. Se estandarizaron las condiciones para la extracción de DNA total de la levadura. Utilizamos finalmente un kit comercial de extracción (Yeastar Genomic DNA kit, Zymo Research) pero utilizando un paso de ruptura con perlas de vidrio y solución de detergentes (Solución Winston: 2% Tritón, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA) Winston y el uso de la enzima Zymolasa a 37°C durante 1 hora. La purificación final se realizó utilizando las columnas del kit comercial. Posteriormente se analizaron los fragmentos por electroforesis en gel de TAE-agarosa al 1%

Diseño y síntesis de primers para la amplificación por PCR y clonación de transportador en la levadura que usaremos. A partir del análisis comparativo de la información de las secuencias nucleotídicas de *C. intermedia* y *D. hansenii* tomada de las bases de datos del GenBank del NCBI y del EMBL (www.ncbi.nlm.nih.gov; www.embl.de) se diseñan diferentes pares de oligonucleótidos para facilitar las tareas de clonación de las regiones reguladoras y codificantes de los genes a partir del ADN total (Tabla 1)

Tabla 1. Diseño y Características de los 4 oligonucleótidos primarios para la amplificación por PCR y posterior clonación del gen completo del transportador de la xilosa a partir del ADN total de *D. hansenii*.

Oligonucleótidos para amplificación del fragmento correspondiente a la región promotora del gen	Oligonucleótidos para amplificación del fragmento correspondiente a la región codificadora
Nombre de oligonucleótido: PDCAF	Nombre de oligonucleótido: GDCAF
Temperatura media de fusión Tm: 54.87	Temperatura media de fusión Tm: 55.06
Tamaño del amplicón: 876 pb	Tamaño del amplicón: 1584 pb
Secuencia: gagctGCATTATCTTCTAAACCCATGT	Secuencia: gtcgACATGGGTTTAGAAGATAATGC
Nombre de oligonucleótido: PDCAR	Nombre de oligonucleótido: GDCAR
Temperatura media de fusión Tm: 55.06	Temperatura media de fusión Tm: 55.12
Tamaño del amplicón: 876 pb	Tamaño del amplicón: 1584
Secuencia: gagctGCATTATCTTCTAAACCCATGT	Secuencia: ctcgAGACTGAAGTGGTTTCAATTC

Amplificación del gen codificador para el transportador de la xilosa mediante PCR. Se realizaron 4 experimentos por separado de amplificación por PCR para amplificar los fragmentos correspondientes a Región Promotora, región codificadora, el terminador y gen completo.

Las reacciones se llevaron a cabo a mediante la metodología estándar de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Los fragmentos amplificados fueron analizados por electroforesis (figura 2) y purificados por un kit comercial (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research).

Clonación del fragmento correspondiente al gen completo del transportador de xilosa de *D. hansenii* amplificado por PCR. Utilizando procedimientos estándares el fragmento amplificado por PCR correspondiente al gen completo del transportador de xilosa de *D. hansenii* amplificado se clonó en el vector pUC19 para su secuenciación y caracterización mientras que el fragmento que corresponde a la región codificadora solamente se lo vamos a insertar en el vector del sistema de clonación *Pichia pastoris* Expression Systems (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

RESULTADOS

Primeramente se optimizaron las condiciones de crecimiento para cada una de las cuatro cepas de levadura que utilizaremos en todo este proyecto. Las características observadas están reflejadas en la tabla 2.

Tabla 2. Cepas de levaduras que se utilizarán en el desarrollo de este proyecto.

Nº	Cepa de levadura,	Criterios de selección
1	<i>Dabranomyces hansenii</i>	Crece bien en xilosa y glucosa. Fuente para la extracción del gen gfx
2	<i>Candida magnoliae</i>	Crece bien en xilosa y glucosa. Fuente para la extracción del gen gfx
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-1 Ura-3-1	Para expresar el gen de interés seleccionando por auxotría (base Ura3) y estudiar el funcionamiento del gen de interés.
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ITM-2014	Sepa sobre productora de etanol.

Se realizó una cinética de crecimiento de las cuatro levaduras de interés para determinar su comportamiento tanto usando glucosa cómo usando xilosa como fuente de carbono. Las levaduras se crecieron en lotes de 50 mL de medios YPD (Extracto de Levadura, Peptona y Glucosa 2%) y YPX (Extracto de Levadura, peptona y xilosa 2%) a 110 rpm y temperatura de 28°C.

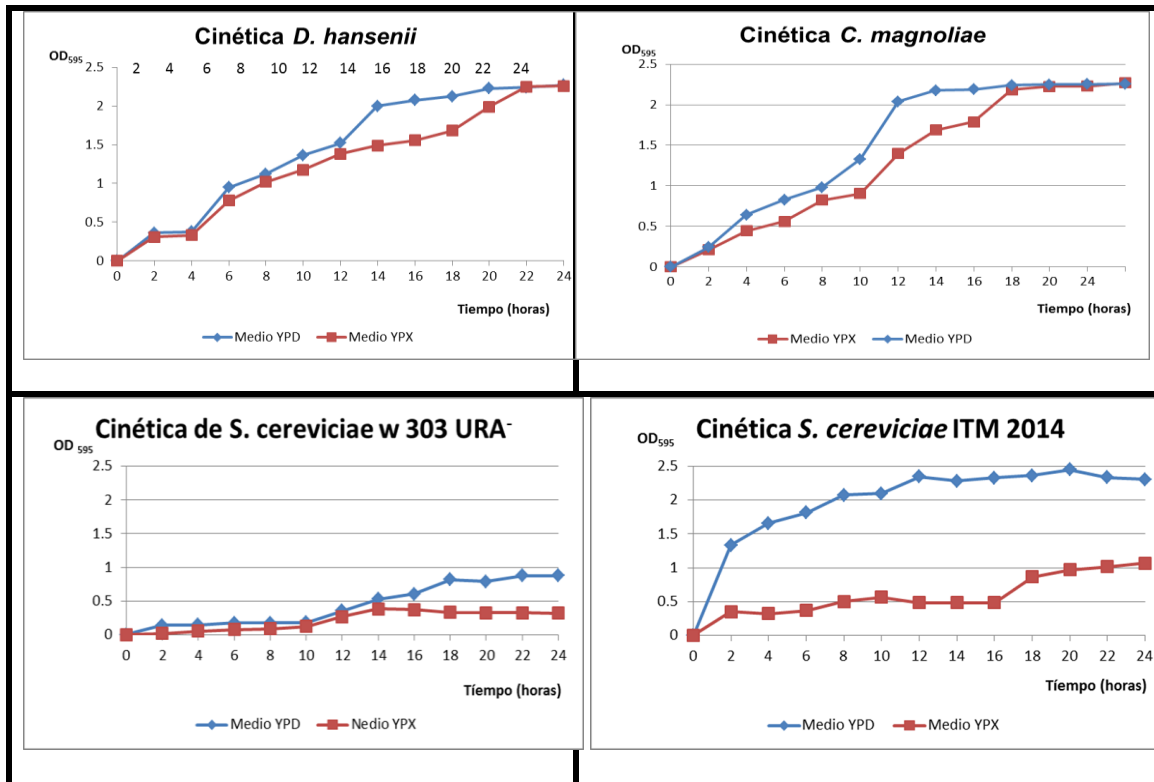


Figura 1. Cinética de Crecimiento en medio YPD y YPX de las *Cándida magnoliae*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae W303-1A Ura-* y *Saccharomyces cerevisiae ITM-2014*

Se tomaron muestras durante 24 horas cada 2 horas y se midieron los parámetros de densidad óptica a 595 nm y pH (foto espectrómetro a luz visible), así como se determinó el número de células por mL de cultivo (sembrando diluciones cada 4 horas). Posteriormente se realizaron las curvas de crecimiento de cada levadura tomando en cuenta la densidad óptica y el tiempo de toma de muestra. El comportamiento se observa en la Figura 1. Se estudió la cinética de crecimiento de las cuatro levaduras de interés el fin de determinar su comportamiento tanto en usando en glucosa como usando xilosa en el medio de cultivo y ver si en la levadura final donde se insertará podemos usar la propia xilosa como marcador de selección de las levaduras que sean transformadas con la construcción final. Esto permitirá transformar e insertar a levaduras *S. cerevisiae*, que consumen fundamentalmente glucosa como fuente de carbono, el gen que les permitirá crecer en xilosa.

Estudio comparativo de secuencias de proteínas transportadoras homólogas en otros sistemas. Realizamos un análisis comparativo de las secuencias conocidas de los transportadores de xilosa (GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov) de *Candida intermedia* con las secuencias correspondiente a los dos genomas completos de *D. hansenii*. Esto nos permitió determinar la región y la secuencia nucleotídica predicha de estos genes homólogos. En la comparación intervinieron secuencias de los genes análogos reportados de *Candida intermedia* PYCC 4715, denominados GXF1 (glucosa/xilosa facilitador) y GXS1 (glucosa/xilosa symporter) con número de acceso AJ875406, así como las secuencias correspondientes a los dos genomas completos de *Debaryomyces hansenii* reportados (*Debaryomyces hansenii* MTCC 234 y *Debaryomyces hansenii* CBS767).

Extracción de DNA total de *D. hansenii* y PCR. Debido a que *D. hansenii* es una levadura no estandarizada para el uso de este kit se realizaron varios ensayos y como resultado se estableció el uso de la ruptura por solución Winston y el uso de la enzima Zymolasa y la purificación por las columnas del kit comercial. Posteriormente se analizaron los fragmentos por electroforesis en gel de TAE-agarosa al 1% (Figura 2). La ruptura perlas de vidrio y solución de detergentes (Solución Winston: 2% Tritón, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA) resultó ser muy eficiente combinándola con el uso de la enzima Zymolasa y las columnas y soluciones de purificación de DNA del sistema comercial Yeastar Genomic DNA kit, (Zymo Research). Se realizaron 4 experimentos por separado de amplificación por PCR para amplificar los fragmentos correspondientes a Región Promotora, región codificadora, el terminador y gen completo. La reacciones se llevaron a cabo a mediante la metodología estándar de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Clonación del gen completo *gxf* codificador del transportador de la xilosa de *D. hansenii*. Los fragmentos correspondientes a región promotora (876 pb), región codificadora (1584 pb), el gen completo (2584 pb), los cuales fueron posteriormente ligados a un vector pUC19 y transformado mediante electroporación en células electrocompetentes *E. coli* XL10-GOLD previamente preparadas. Estas fueron sembradas sobre placas de medio lb y fueron seleccionadas las colonias blancas, las cuales nos indicaron que esas células contenían el inserto de DNA. La manipulación de este gen se lleva a cabo para colocarlo en un vector plasmídico del tipo pYES que permite usar Uracilo como marcador de auxotrofia y para verificar su expresión y funcionamiento en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A Ura⁻ y posteriormente usar un vector de integración (no plasmídico) para transformar la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ITM-2014. Los transformantes de esta cepa serían seleccionados en cajas con medio YPX (xilosa 2%) y se verificaría usar indistintamente o al mismo tiempo tanto glucosa como xilosa como fuentes de carbono. Esto, unido a la capacidad sobre productora de etanol de esta cepa ofrece una posibilidad de optimizar el proceso de fermentación alcohólica, tanto en la industria mezcalera, de vinos y licores cuya fermentación sea en base a sustratos frutícolas diversos, como en la fermentación de biomasa para biocombustibles.

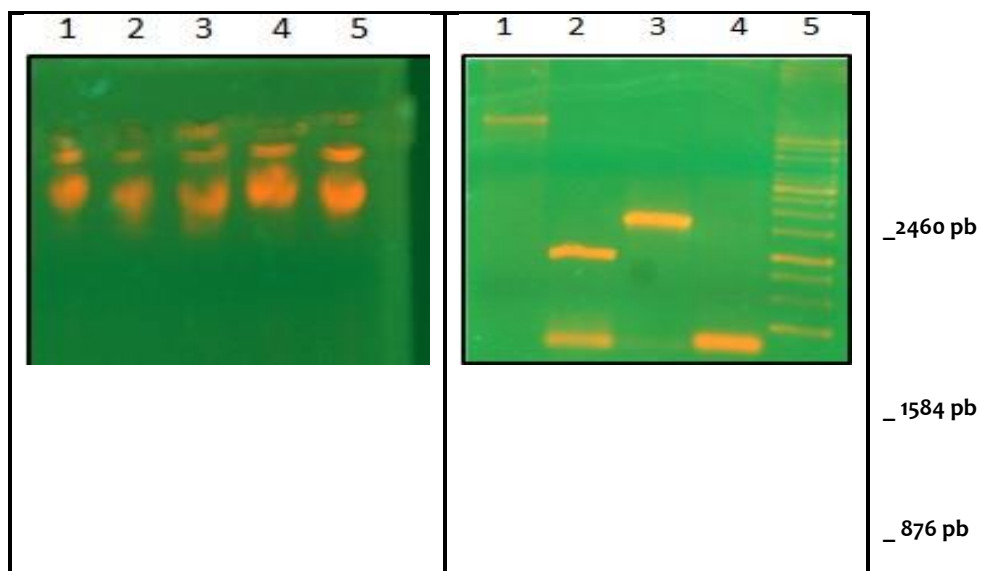


Figura 1. A: Electroforesis de DNA total de las levaduras: 1. *D. hansenii*, 2. *C. magnoliae*, 3. *S. cerevisiae* W303-Ura⁻, 4. *S. cerevisiae* ITM2014, 5. *Pichia pastoris* (control de integridad). B: Amplificación de los fragmentos correspondientes al gen del transportador de la xilosa en *D. hansenii*. 1. Gen *gxf* completo de *D. hansenii*, 2. Región promotora, 3. Región codificadora y el terminador 4. PCR a partir de *S. cerevisiae* ITM 2014 (control negativo), 5. Marcador de Peso molecular 1 kb Ladder. Restos de los oligonucleótidos se observan en la parte baja del gel.

CONCLUSIONES

C. magnoliae y *D. hansenii*, pueden crecer utilizando indistintamente glucosa o xilosa como fuente de carbono. Las cepas de *S. cerevisiae* W303-1A Ura- y *S. cerevisiae* ITM-2014 crecen lentamente en YPX y de manera normal en YPD, por lo que deducimos que al transformarlas con el gen del transportador de la xilosa crecerá mejor en medios ricos en xilosa. *Saccharomyces cerevisiae* ITM-2014 tiene un elevado potencial para el aprovechamiento de hidrolizados lignocelulósicos, lo cual ha sido ampliamente estudiado para que se lleve a cabo esta bioconversión.

BIBLIOGRAFÍA

- GIRIO F.M., ROSEIRO J.C., SA-MACHADO P., DUARTE-REIS AR & AMARAL-COLLACO M.T. (1994) Effect of oxygen transfer rate on levels of key enzymes of xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 1074-1078.
- KOTTER P., AMORE R., HOLLENBERG C.P. & CIRIACY M. (1990) Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, *XYL2*, and construction of a xyloseutilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Curr. Genet.* 18: 493-500.
- BARBOSA, M.F.S., DE MEDEIROS, M.B., DE MANCILHA, I.M., SCHNEIDER, H. & LEE, H. 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J Indust Microbiol.* 3, 241-251.
- HO, N.W., CHEN, Z. Y BRAINARD, A.P.(1998). Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (5):1852-9.
- LEANDRO, M.J. GONCALVES, P. Y SPENCER-MARTINS, I. (2006). Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. *Biochem. J.* (2006) 395, 543-549
- KERN, M., HALTRICH, D., NIDETZKY, B. Y KULBE, D. K. (1997). Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS 4435. *FEMS Microbiol. Lett.* 149: 31-37.
- GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C., CÁRDENAS-MONROY, C. A. AND PEÑA, A. (2004) Sodium and potassium transport in halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast.* 21: 403-412.
- GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C., JIMÉNEZ-ESTRADA, M. Y PEÑA, A. 2005. Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles.* 9 (1): 7-16.