

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

Estudio de la Regulación de Xilosa Reductasa y Xilitol

Deshidrogenasa en *Cryptococcus humicola* OJ-31

T E S I S

Que presenta

Alejandra Jimena Santiago Benítez

Para obtener el grado

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de tesis

Dra. María Teresa Ponce Noyola

Ciudad de México

Octubre 2017

Créditos

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética Microbiana del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco (CINVESTAV-Zacatenco), bajo la dirección de la Dra. María Teresa Ponce Noyola.

El trabajo realizado fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyecto CB-14/236895).

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Teresa Ponce Noyola por aceptarme como estudiante además de toda su guía, paciencia, apertura y constante retroalimentación para siempre mejorar.

A la doctora Ana Ramos y el doctor Luis Miguel Salgado por ser parte del comité de esta tesis y por sus comentarios y sugerencias durante todo el proyecto.

A la M. en C. Odilia Perez Avalos por su asesoría en todas las técnicas implementadas para la extracción de RNA y su gran disposición de ayudar en todo momento; así como a Verónica Soto por todo el apoyo y amistad.

A la doctora Dulce María Delgadillo por el apoyo brindado en los ensayos de qPCR.

A mis compañeros de laboratorio por siempre estar dispuestos a ayudarme además de propiciar un ambiente lleno de amistad y compañerismo: Javier, Citlali, Jessica, Erika, Fernando y Miguel.

A mis papás Mario y Jose por apoyarme y animarme todo el tiempo, además de cuidarme cuando más lo necesité y no podía sola. A mi amigo Sean por ser el mejor amigo Sean.

A Samuel por nunca dejar de motivarme, creer en mí; por todo el cariño y complicidad.

A mis amigas Goro por siempre estar ahí y por todos los años de risas ilimitadas.

A todos mis tíos y primos por su cariño incondicional.

RESUMEN

El bioetanol es un biocombustible de 2^a generación dado que es producido a partir de desechos agroindustriales o cultivos no aptos para consumo humano.

La xilosa es el segundo azúcar más abundante en los residuos agroindustriales por lo que se han buscado microorganismos capaces de asimilar y fermentar la xilosa a etanol. Los géneros más utilizados para la producción de etanol a partir de xilosa son *Candida* y *Kluyveromyces*, ya que estas levaduras cuentan con enzimas clave para la asimilación y eventual fermentación de la xilosa como son la xilosa reductasa (XR) y la xilitol deshidrogenasa (XDH). En este trabajo se seleccionó la levadura basidiomiceta *Cryptococcus humicola* proveniente de mostos de mezcal de Oaxaca y con capacidad de asimilar la xilosa. *C. humicola* OJ-31 se cultivó en medio mínimo con xilosa o glucosa en condiciones aerobias y anaerobias. Cuando la levadura creció en xilosa, en condiciones aerobias se encontró actividad enzimática de XR y XDH ligada al crecimiento mientras que al crecer en glucosa no se observó un aumento o cambio en la actividad. En condiciones aerobias se observó consumo de xilosa y producción de xilitol, mientras que en condiciones anaerobias a pesar de cuantificarse actividad enzimática, el consumo de la pentosa fue muy lento y bajo comparado con las condiciones aerobias. Se midió el nivel de expresión de los genes codificantes para XR y XDH y se observó bajo las dos condiciones mencionadas anteriormente un aumento de la expresión de ambos genes.

ABSTRACT

Bioethanol is a biofuel of second generation due to the use of agroindustrial residue or crops that are not apt for human consumption as raw material for its production. The fermentation of hexoses and pentoses, from the cellulose and hemicellulose fractions respectively, of lignocellulosic origin is sought in the process for bioethanol production. Xylose is the second most abundant sugar in agroindustrial residues. For this reason scientists have searched microorganisms, capable of xylose assimilation and fermentation. The most used yeast genera are *Candida* and *Kluyveromyces*. In order to produce ethanol from xylose, xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH) are key enzymes in yeast. *Cryptococcus humicola* was isolated from mezcal mash in Oaxaca with the ability to grow in xylose. *C. humicola* OJ-31 was grown in a minimum medium with either xylose or glucose in aerobic and anaerobic conditions. Increased enzymatic activity of XR and XDH was determined when the yeast was grown in xylose, whereas in glucose the activity found was low and non-changing. In aerobic conditions relevant xylose consumption and xylitol production was observed; on the other hand, in anaerobic conditions these were very low compared with the aerobic conditions. Gene expression of XR and XDH was measured; an increase in expression of both genes was found when the yeast was grown both anaerobic and aerobic conditions.

Contenido

I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Bioenergéticos	1
1.2 Bioetanol de segunda generación.....	3
1.3 Microorganismos fermentadores de xilosa	6
1.4 Rutas metabólicas	9
1.5 Xilosa reductasa y Xilitol deshidrogenasa	12
II JUSTIFICACIÓN	21
III HIPÓTESIS	22
IV OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos específicos	23
V MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1. Microorganismos empleados y condiciones de cultivo.....	24
5.2 Medios de cultivo	24
5.2.1 YPD	24
5.2.2 YM.....	24
5.2.3 Breus	24
5.3 Preparación del inóculo	25
5.4 Curva de crecimiento celular	25
5.5 Determinación de actividad enzimática.....	25
5. 6 Cuantificación de proteína por Lowry-Folin	27
5.7 Cuantificación de azúcares reductores por DNS.....	27
5.8 Cuantificación de azúcares y productos en HPLC	28
5.9 Extracción de RNA	28
5.10 Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos	30
5.11 Síntesis de cDNA	30
5.12 PCR punto final.....	30
5.13 PCR en tiempo real.....	31
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1 Determinación del tiempo adecuado para el crecimiento del inóculo	33
6.2 Determinación de la actividad de XR y XDH.....	34

6.3 Comparación de crecimiento y actividad enzimática de <i>C. humicola</i> - OJ31 en xilosa y glucosa.....	38
6.4 Actividad enzimática posterior al consumo de xilosa.....	46
6.5 Inducción por otras fuentes de carbono.....	51
6.6 Represión de XR y XDH por glucosa	53
6. 7 Extracción de RNA	55
6.8 Síntesis de cDNA para cuantificación de <i>xr</i> y <i>xdh</i>	58
6.9 Diseño de oligonucleótidos para <i>xr</i> y <i>xdh</i>	60
6.10 Cuantificación de transcritos para <i>xr</i> y <i>xdh</i> de <i>C. humicola</i> OJ-31.....	65
VII. CONCLUSIÓN.....	72
VII REFERENCIAS	73

Índice de Figuras

Figura 1 Etapas en la producción de Bioetanol de primera y segunda generación	3
Figura 3 Enzimas necesarias para la asimilación de xilosa por levaduras	
Figura 4 Aminoácidos que conforman el sitio de unión con bi-afinidad a NAD y NADH en XR	16
Figura 5 Aminoácidos que determinan la preferencia por NAD de XDH	19
Figura 6 Cinéticas de crecimiento de <i>C. humicola</i> OJ-31	34
Figura 7 Actividad enzimática de XR y XDH de <i>C. humicola</i> OJ-31 incubada en condiciones anaerobias en presencia de xilosa.....	35
Figura 8 Actividad enzimática de XR de <i>C. humicola</i> OJ-31 en condiciones aerobias y anaerobias en medio Breus-X.....	37
Figura 9 Actividad de XDH de <i>C. humicola</i> OJ-31 en condiciones aerobias y anaerobias en medio Breus-X.....	38
Figura 10 Crecimiento de <i>C. humicola</i> OJ-31 en xilosa y glucosa.....	39
Figura 11 Actividad específica de XR de <i>C. humicola</i> OJ-31 cultivada en xilosa y glucosa..	41
Figura 12 Actividad específica de XDH de <i>C. humicola</i> OJ-31 cultivada en xilosa y glucosa.	41
Figura 13 Actividad específica de XR de <i>C. humicola</i> OJ-31 cultivada en xilosa y glucosa 4 mL.....	42
Figura 14. Actividad específica de XDH de <i>C. humicola</i> OJ-31 cultivada en xilosa y glucosa 4 mL.....	43
Figura 15. Actividad específica de XR de <i>C. humicola</i> OJ-31 en condiciones aerobias y anaerobias.....	47
Figura 16. Actividad específica de XDH de <i>C. humicola</i> OJ-31 en condiciones aerobias y anaerobias.....	48
Figura 17 Consumo de xilosa de <i>C. humicola</i> OJ-31 en condiciones aerobias y anaerobias.....	49

Figura 18. Inducción de actividad enzimática de XR y XDH de <i>C. humicola</i> OJ-31 en condiciones aerobias por diferentes fuentes de carbono.	53
Figura 19. Efecto de la glucosa sobre la actividad de XR de <i>C. humicola</i> en condiciones aerobias.	54
Figura 20. Efecto de la glucosa sobre la actividad de XDH de <i>C. humicola</i> OJ-31 en condiciones aerobias.	54
Figura 21. RNA de RNA de <i>C. humicola</i> OJ-31 extraído con 2 técnicas	57
Figura 22. Comparación entre 3 protocolos de extracción de RNA de <i>C. humicola</i> OJ-31.	58
Figura 23. PCR punto final utilizando productos de síntesis de cDNA a partir de RNA extraído de <i>C. humicola</i> OJ-31.....	60
Figura 24. Gel de agarosa con productos de PCR.....	63
Figura 25. Productos de PCR utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de <i>C. humicola</i> OJ-31; oligos para actina, XR y XDH.....	65
Figura 26. Gel de agarosa con muestras de reacción de PCR.	67
Figura 27. Gel de agarosa con productos de PCR.....	68

I INTRODUCCIÓN

1.1 Bioenergéticos

Los combustibles de origen fósil han sido pilares en el desarrollo de la sociedad. En México el 90% de la producción de energía proviene únicamente de los hidrocarburos lo que ha provocado un aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero y la reducción de reservas de petróleo. Nuestro país importaba petróleo a principios de los años setenta en respuesta a un acelerado proceso de urbanización, sin embargo en 1979, México se convirtió en exportador cuando se descubrieron diversos yacimientos de petróleo. Después de quince años estos yacimientos comenzaron un proceso de declinación, en donde pronto no se podrá encontrar más petróleo para su extracción (SENER 2013). Lo mismo sucede alrededor del mundo, 77% de la producción actual de este tipo de combustible proviene de yacimientos en declive. Actualmente se buscan yacimientos en aguas profundas, lo que conlleva una mayor inversión, tiempo de desarrollo de proyectos y complejidad tecnológica, así como grandes riesgos para los hábitats que rodean estas zonas (Padilla et al., 2011).

Como respuesta a este problema nacional, el 1^{ro} de febrero de 2008 se publicó la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos que promueve la producción de insumos y materia prima, así como la producción, transporte y comercialización de bioenergéticos. La ley incluye la investigación para el desarrollo de bioenergéticos de 2^a y 3^a generación, los cuales: no representan una amenaza para la seguridad y soberanía alimentaria; mantienen un balance energético positivo; permiten reducir

impactos negativos sobre el ambiente; potencian la diversificación de cultivos; implican menores costos de producción, y son proyectos de fácil adaptación cuyos modelos pueden replicarse (Secretaría de Energía 2009). La importancia de la diversificación de fuentes primarias de energía es que favorece la seguridad energética en el país al disminuir la dependencia en una sola fuente de energía.

Uno de los biocombustibles de 2ª generación es el bioetanol producido a partir de desechos agroindustriales o cultivos no aptos para consumo humano, por ejemplo de la palma principalmente en Veracruz, Jalisco, Tabasco y Chiapas; y sorgo dulce en los estados de Sinaloa, Tamaulipas, Michoacán y península de Yucatán (SAGARPA, 2012). De los desechos agroindustriales existe un gran potencial en el bagazo de caña, ya que se estima una generación de electricidad a partir de éste, superior a 3,000,000 MWh al año (CONAE, 2007) .

El uso de bioetanol tiene varias ventajas:

- Puede reducir la emisión de CO₂ en un 30-50%

- Posee un balance energético positivo

- Puede ser biodegradado fácilmente en agua y suelo

- Puede ser utilizado en mezclas con gasolina con algunas modificaciones al motor

- No es tóxico

- Es una fuente de energía renovable

(Bajpai, 2013)

1.2 Bioetanol de segunda generación

Los procesos para la obtención de bioetanol difieren entre sí dependiendo del material que se utiliza, pero algunas de las etapas son equivalentes aunque ocurran con diferentes condiciones de temperatura, presión o los microorganismos usados sean de diferentes especies. Estas etapas son hidrólisis, ya sea enzimática o química, fermentación y destilación. En la figura 1 se presentan los procesos para la obtención de etanol de primera y segunda generación.



Figura 1. Etapas en la producción de Bioetanol de primera y segunda generación (modificado de Bajpai, 2013)

Una clara ventaja del bioetanol de segunda generación sobre el de primera es que no utiliza como materia prima cultivos de consumo humano. En un país como México que no tiene sobreproducción de este tipo de cultivos, maíz o caña de azúcar por ejemplo, el bioetanol de primera generación no es una opción viable. Aunado a esto, el etanol que se obtiene de celulosa contiene 16 veces más de energía que la necesaria para producirlo, la gasolina 5 veces más que la invertida y el etanol de primera generación, por ejemplo de almidón de maíz, únicamente 1.3 veces (Bajpai,

2013). Por esta razón existen muchos estudios para la obtención de un proceso óptimo para la producción de este combustible de segunda generación. Los retos principales para lograr una alta productividad de bioetanol a partir de material lignocelulósico son los siguientes: mejorar la hidrólisis enzimática con enzimas eficientes; reducir el costo de producción de éstas; desarrollar la tecnología para el manejo de sólidos; desarrollar microorganismos capaces de tolerar inhibidores y fermentar todo tipo de azúcares provenientes de los hidrolizados incluso a altas concentraciones de etanol; integrar diferentes procesos para reducir el número de etapas así como la demanda de energía y reusar ciertos flujos para reducir el uso de agua (Hahn-Hägerdal et al., 2006).

En el proceso de producción de bioetanol de segunda generación a partir de desechos agroindustriales el pretratamiento que requiere el material lignocelulósico es clave para la obtención de materiales altamente fermentables. La composición de éste es determinante tanto en el proceso como en el rendimiento. Los residuos agroindustriales se componen mayoritariamente de celulosa, hemicelulosa y lignina. La composición y los porcentajes de estos tres polímeros varían entre cada especie de plantas y residuos, y las diferencias entre sus estructuras químicas dan lugar a variadas características fisicoquímicas (Pérez et al., 2002). En la Tabla 1 se muestra la composición de algunos materiales lignocelulósicos.

Tabla .1 Composición de algunos materiales lignocelulósicos

Materia prima	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Residuos de madera dura	40-55	24-40	18-25
Mazorca de maíz	45	35	15
Pasto	25-40	35-50	10-30
Paja de trigo	30	50	15
Bagazo de caña	35-50	25-35	16-25

(Sun y Chen, 2002)

La celulosa, hemicelulosa y lignina no se encuentran como unidades individuales en una célula vegetal sino como biopolímeros altamente interconectados. La lignina y los carbohidratos forman estructuras complejas que poseen alta resistencia. (Himmel et al., 2007). La celulosa es un homopolímero lineal y cristalino formado por unidades de glucosa unidas por enlaces beta-glucosídicos, que además de diferenciarla de otros polímeros de glucosa formados con enlaces alfa-glucosidos; le confiere la característica de formar una estructura resistente a la hidrólisis por la dificultad de romper este tipo de enlaces. La hemicelulosa está formada por cadenas de azúcares cortas que pueden ser lineales o ramificadas. A diferencia de la celulosa que es un

homopolímero, la hemicelulosa es un heteropolímero formado por D-xilosa, D-glucosa, D-galactosa, D-manosa y L-arabinosa. La lignina es un polímero conformado en su mayoría por unidades de fenilpropano lo que resulta en un compuesto muy complejo y recalcitrante además de que es resistente al ataque microbiano (Stelte et al., 2011).

Dadas las características específicas del material lignocelulósico, el pretratamiento es utilizado para acceder a la biomasa degradando la estructura de lignina para liberar a los polisacáridos (Mosier 2005). Esta etapa es seguida de un tratamiento con enzimas que hidrolizan celulosa y hemicelulosa. La fracción de la celulosa da lugar a celooligosacáridos, celodextrinas, celobiosa y en el mejor de los casos glucosa; mientras que la fracción de la hemicelulosa consiste principalmente en xilosa lo que la convierte en el segundo azúcar más abundante (Yang et al. 2011). La glucosa es fácilmente fermentada por la mayoría de los microorganismos, mientras que para la fermentación de la xilosa es requerido otro proceso con microorganismos específicos que asimilen esta pentosa.

1.3 Microorganismos fermentadores de xilosa

Los organismos más utilizados para la producción de etanol son las levaduras por su alta productividad, baja producción de inhibidores y resistencia a altas concentraciones del mismo. Los géneros más utilizados son *Candida (seudotropicalis)*, *Saccharomyces (cerevisiae, ellipsoideus, anamensis, carlsbergensis)* y *Kluyveromyces marxianus* y *fragilis* (Krishna et al., 2001). Sin embargo *S. cerevisiae*, la levadura que más se ha explotado para fermentaciones alcohólicas, no es capaz de fermentar azúcares como celobiosa, xilosa, arabinosa,

lactosa, rafinosa, o inulina. Por esta razón se han buscado otros microorganismos capaces de asimilar y fermentar este tipo de azúcares. Como ya se mencionó anteriormente, la xilosa es el azúcar más abundante en los residuos lignocelulósicos después de la glucosa. Por lo que es de gran importancia para el desarrollo de procesos eficaces para la obtención de bioetanol, la búsqueda y el diseño de microorganismos que sean capaces de utilizar esta pentosa de forma altamente productiva.

Tabla 2. Microorganismos fermentadores de xilosa para la producción de etanol

	Silvestres	Recombinantes
Levaduras		
	<i>Brettanomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>
	<i>Candida</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
	<i>Clavispora</i>	
	<i>Kluyveromyces</i>	
	<i>Pachysolen</i>	
	<i>Pichia</i>	
	<i>Schizosaccharomyces</i>	
Hongos	<i>Fusarium</i>	-
	<i>Monilia</i>	
	<i>Mucor</i>	
	<i>Neurospora</i>	
	<i>Paecilomyces</i>	
	<i>Polyporus</i>	
	<i>Rhizopus</i>	

Bacterias	<i>Aerobacter</i>	<i>Erwinia</i>
	<i>Aeromonas</i>	<i>Escherichia</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>Klebsiella</i>
	<i>Bacteroides</i>	
	<i>Clostridium</i>	
	<i>Erwinia</i>	
	<i>Klebsiella</i>	
	<i>Thermoanaerobacter</i>	

(McMillan, 1993)

Cryptococcus humicola es una levadura basidiomiceta que ha sido aislada de distintos hábitats como plantas y suelo (Fell & Statzell-Tallman, 1998). Esta levadura forma colonias blancas-amarillentas, lisas, y planas. Sus células se observan ovaladas, cilíndricas y con forma de limón. La razón por la que probablemente no se haya incluido en la selección de McMillan es porque hay pocos reportes sobre esta levadura además de que no coinciden en lo encontrado. Se ha reportado que esta levadura es capaz de fermentar pentosas, como la xilosa, a etanol como producto final (Golubev 1994; Takashima et al., 2001). Sin embargo otros trabajos han reportado que no asimila la xilosa (Morais et al., 2013).

Otras fuentes de carbono inusuales que puede asimilar *C. humicola* son: L-sorbosa, trehalosa, melibiosa, rafinosa, D-arabinosa, L-ramnosa, eritriol, ribitol, inositol, xilitol y L-arabinol (Takashima et al., 2001).

1.4 Rutas metabólicas

La manera en que las levaduras, específicamente *C. humicola*, integran la xilosa a su metabolismo es a través de la interconversión de pentosas a hexosas sin reacciones de tipo oxidación-reducción en la vía de las pentosas-fosfato (figura 2). Esta vía permite la síntesis de hexosas cuando se tiene como fuente de carbono pentosas, y también permite la síntesis de otros azúcares como la pseudoheptulosa-7-fosfato, la eritrosa-4-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato. (Voet et. al, 2006).

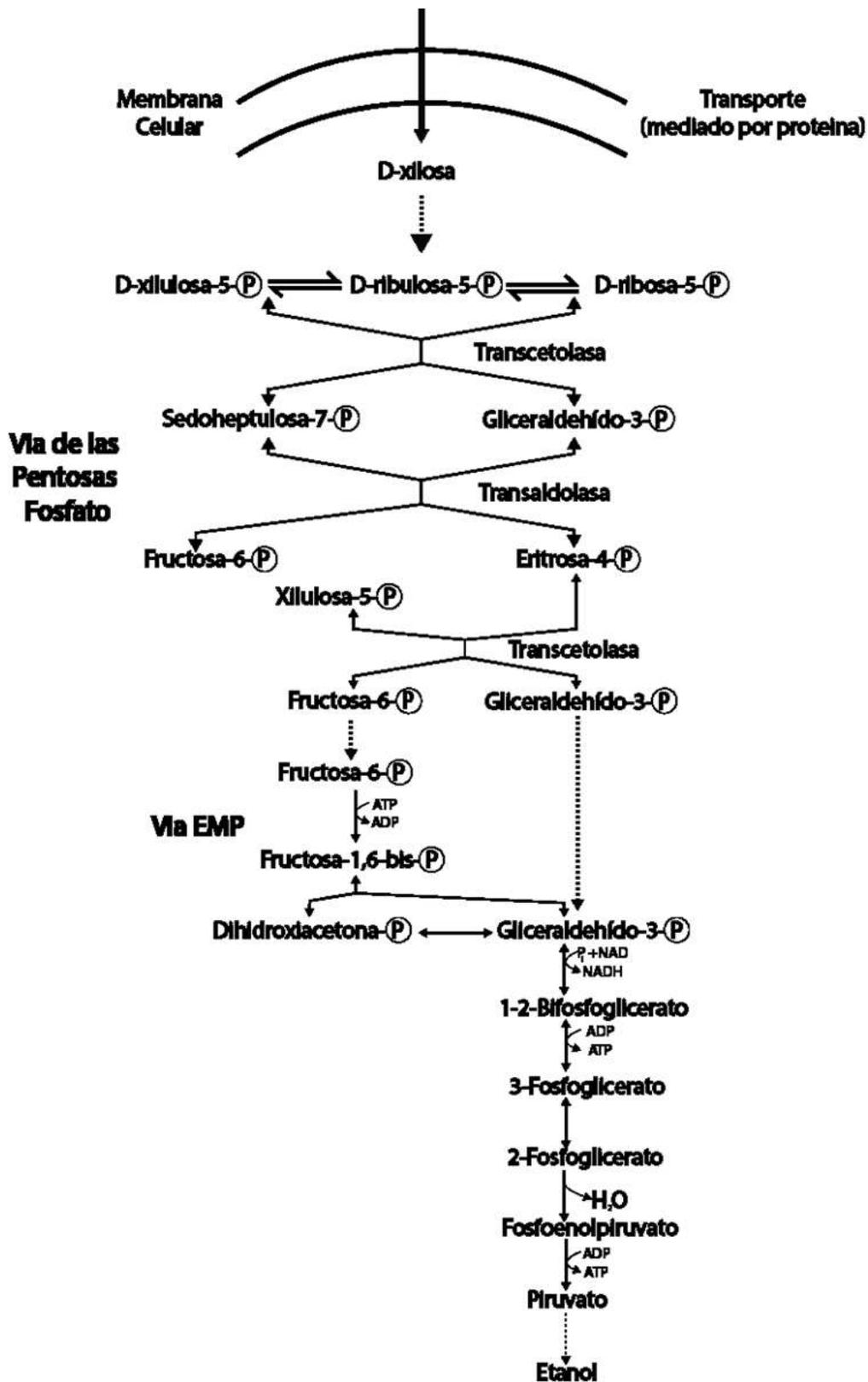


Figura 2. Introducción de la xilosa a la ruta de las pentosas fosfato (McMillan, 1993)

Una vez que la xilosa es transportada al interior de la célula y transformada a xilulosa-5-fosfato se integra a la vía de las pentosas fosfato. La xilosa debe de ser convertida a xilulosa y posteriormente fosforilada antes de entrar a esta vía. Dentro de la vía de pentosas fosfato la xilulosa-5-fosfato es metabolizada a gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato. Ambos compuestos son convertidos a piruvato en la vía Embden-Meyerhof Parnas, y éste es finalmente convertido a etanol. En la reacción 3 moles de xilosa son necesarias para producir 5 moles de etanol.

El balance se muestra en la ecuación 1.



El rendimiento teórico estequiométrico es 0.51 g etanol/g xilosa o 1.67 mol etanol/mol xilosa (McMillan, 1993).

Existen dos rutas alternativas para el metabolismo de xilosa: la desviación por fosfocetolasa, y la oxidativa. El “bypass” de fosfocetolasa convierte xilulosa-5-fosfato a gliceraldehído-3-fosfato y acetilfosfato. El gliceraldehído-3-fosfato entra a la ruta de glicólisis, mientras que el acetilfosfato es convertido a acetato con la formación de ATP. Esta ruta alternativa se ha observado en *P. tannophilus* y probablemente sea una vía importante para para la generación de ATP sobretodo en condiciones anaeróbicas (Evans y Ratledge 1984; Jeffries, 1990). Por otro lado, el bypass oxidativo, como su nombre lo dice, oxida la fructosa-6-fosfato a ribulosa-5-fosfato y dióxido de carbono a través del intermediario 6-fosfo-gluconato (Bruinenber et al., 1983). La desviación por fosfocetolasa, que lleva a cabo la escisión vía introducción

de un fosfato de la xilulosa, es una ruta alterna que se puede llevar a cabo paralelamente a la vía de las pentosas fosfato y está presente en algunas levaduras con un metabolismo eficiente de pentosas.

1.5 Xilosa reductasa y Xilitol deshidrogenasa

La xilulosa puede ser metabolizada por cualquiera de las rutas ya mencionadas, sin embargo para su obtención a partir de la xilosa son necesarias dos enzimas en levaduras: la xilosa reductasa (XR) y la xilitol deshidrogenasa (XDH). Ambas enzimas se encuentran en el citosol (McMillan, 1993). La xilosa reductasa como su nombre lo dice, lleva a cabo la reducción de la xilosa a xilitol. Por otro lado, la xilitol deshidrogenasa convierte el xilitol en xilulosa (figura 3) la cual entra a la ruta de las pentosas fosfato una vez fosforilada por la enzima xilulosa cinasa. Las bacterias carecen de estas enzimas, sin embargo poseen un gen que codifica para la xilosa isomerasa que cataliza la transformación de xilosa a xilulosa.

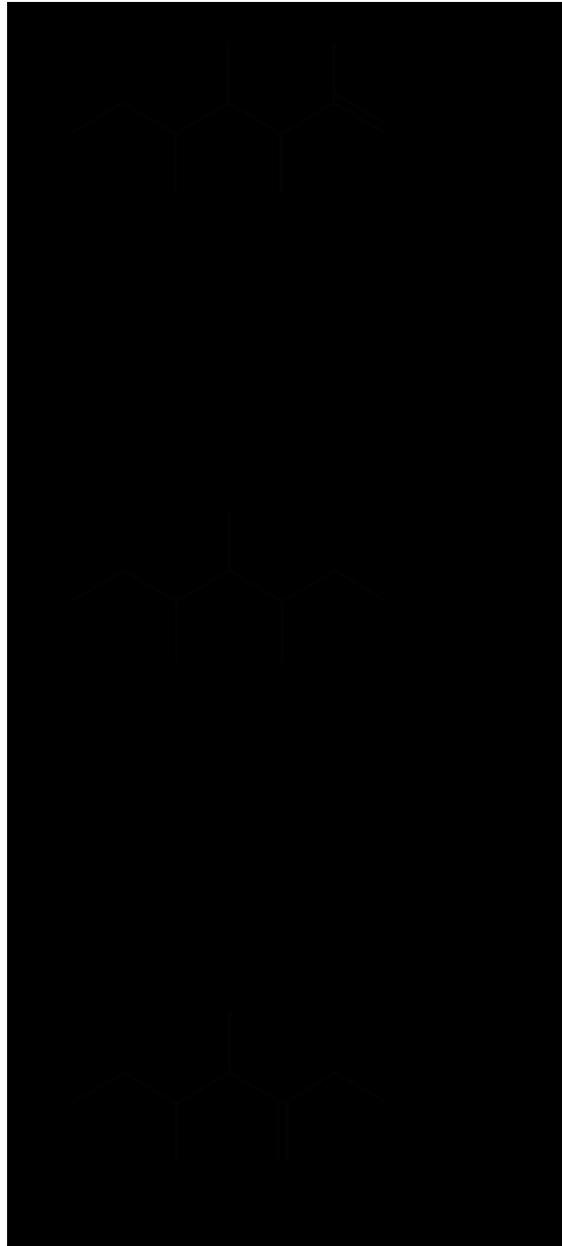


Figura 3. Enzimas necesarias para la asimilación de xilosa por levaduras (McMillan, 1993).

Para que se lleven a cabo las reacciones de conversión a xilulosa a partir de la xilosa, son necesarios cofactores específicos para cada una de las enzimas. XR tiene afinidad tanto para NAD como para NADP, mientras que XDH utiliza como cofactor el par redox, NADH o NADPH. La predilección del cofactor depende de cada

especie de levadura, por ejemplo, se ha reportado que la XR de algunas levaduras pertenecientes al género *Candida*, tienen preferencia por NADPH, mientras que las de *C. shehatae* y *P. stipitis* prefieren NADH.

La xilosa reductasa es una proteína de 322 aminoácidos y 36 kDa, pertenece a la familia 2 de las aldo-ceto reductasas (AKR). XR es homodimérica a diferencia de la mayoría de las enzimas pertenecientes a la familia AKR ya que la mayoría de éstas funcionan como monómeros. Otra característica inusual de XR es su habilidad para utilizar eficientemente dos cosustratos, aunque con distinta afinidad dependiendo la especie de levadura. Esta proteína se pliega en 8 barriles (β/α), que es de las estructuras más comunes en enzimas. La proteína forma dímeros por medio de una región hidrofílica inusual formada por residuos del barril número 4, así como residuos que conectan la estructura plegada 4 con la hélice 4, y algunas interacciones con hélices 5 y 6. Este conjunto de estructuras dirigen los sitios activos del dímero en una conformación antiparalela. El co-sustrato se une a la cara del barril formado y ayuda a acomodar de alguna forma el sitio de unión al sustrato. En los ensayos de cristalografía se observan las 4 unidades de 322 aminoácidos con 873 moléculas de agua ordenadas, unidas a cada monómero.

Para catalizar la reacción de reducción, XR posee un mecanismo ordenado, en el cual el cofactor se une antes que el sustrato, y se disocia al final. La afinidad por los dos cofactores se puede medir por su K_m , por ejemplo de *C. tenuis* tiene una constante de 25.4 μM para NADH, mientras que para NADPH es de 4.8 μM . Esto hace que tenga una preferencia mayor por el cofactor fosforilado a pesar de que sea capaz de utilizar ambos.

La forma en que el cofactor se une, es por el ciclo de adenina en una zona hidrofóbica conservada formada por Phe 220, Phe 240, y Ala 257. Por otro lado, la adenosina se une al grupo guanidinio de Arg280 que se encuentra con una carga positiva. Cuando XR interactúa con NAD, el aminoácido Lys274 que normalmente estaría interactuando con el grupo fosfato en el caso de NADP, gira y forma un puente de hidrógeno con moléculas presentes en solución. El residuo de Asn276, que previamente formaba un puente de hidrógeno con uno de los oxígenos del grupo fosfato del NADP, rota hacia la ribosa para formar un puente de hidrógeno con el oxígeno de la pentosa (posición dos). Este residuo ocupa el sitio que ocuparía el fosfato de la posición dos. De esta manera, el puente de hidrógeno entre el oxígeno del fosfato y el grupo NH de Asn276 se pierde (Kavanagh et al., 2003).

El aminoácido más importante para la bi-afinidad, parece ser Glu227 que es capaz de formar dos puentes de hidrógeno con los dos grupos OH de la ribosa desfosforilada. En el caso de las levaduras cuya XR prefiere NADPH, no es que el carboxilo de Glu227 sea incapaz de hacer este tipo de interacciones con la ribosa, sin embargo como se observa en la figura 4, es una estructura de baja estabilidad por su alta tensión estereoquímica (Jeppsson et al., 2006).

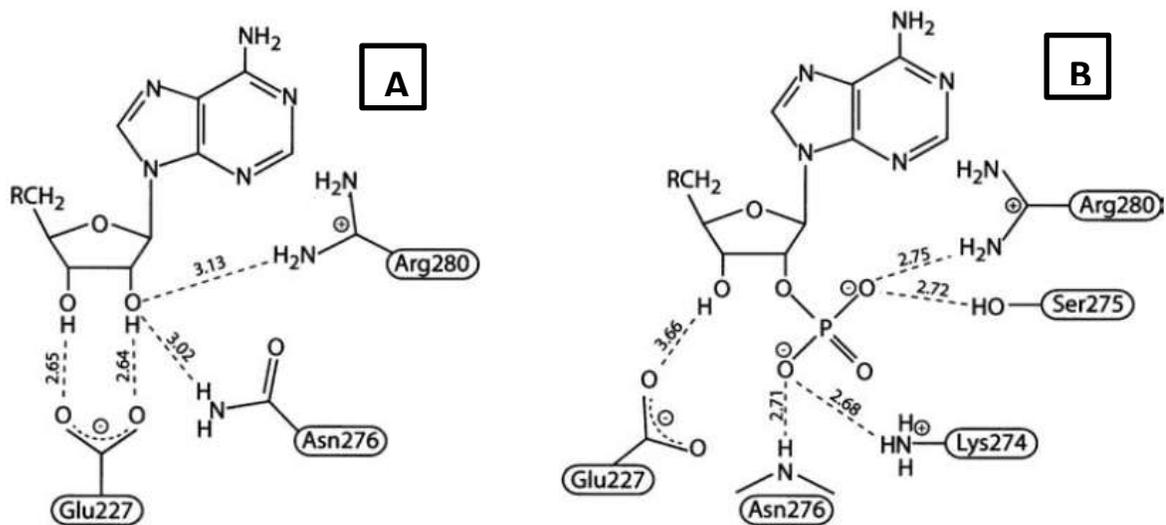


Figura 4. Aminoácidos que conforman el sitio de unión con bi-afinidad a NAD (A) y NADH (B) en XR (Kavanagh et al., 2003)

La preferencia por uno de los cofactores, ya sea NADPH o NADH puede afectar la proporción entre la producción de xilitol y D-xilulosa. De manera que XR de *P. tannophilus* tiene casi la misma preferencia tanto por NADPH que por NADH y produce cantidades muy parecidas de etanol y xilitol; mientras que *C. shehatae* y *P. stipitis* que prefieren NADH producen en su mayoría etanol. Yablochkova et al. (2003) proponen una clasificación en función de la actividad enzimática de XR según la preferencia de cofactor (Tabla 3). Aquellas levaduras que tienen preferencia por NADPH presentan mayor actividad al utilizar este cofactor en los ensayos de actividad enzimática (Grupo I), los que poseen la misma preferencia presentan una actividad enzimática muy parecida (Grupo II), mientras que las que prefieren NADH, tienen mayor actividad al utilizar este cofactor (Grupo III) al cual únicamente pertenece *P. stipitis*.

Tabla 3. Afinidad de XR por NADPH y NADH en diferentes levaduras.

Especie	Actividad específica $\mu\text{mol}/(\text{min mg proteína})$	
	NADPH	NADH
<i>C. didensiae</i>	0.63	0.03
<i>C. intermediae</i>	4.74	0.16
<i>C. parapsilosis</i>	0.90	0.04
<i>C. silvanoru</i>	5.10	0.26
<i>C. tropicalis</i>	6.43	0.14
<i>K. marxianus</i>	0.16	<0.01
<i>P. guilliermondii</i>	0.61	0.02
<i>T. molishiana</i>	0.11	<0.01
<i>P. tannophilus</i>	2.05	1.39-1.56
<i>C. shehatae</i>	3.40	4.39
<i>P. stipitis</i>	4.84	10.37

(Yablochkova et al., 2003)

XDH es una deshidrogenasa/reductasa de cadena media (MDR – por sus siglas en inglés médium chain dehydrogenase/reductase) con una masa atómica promedio de 39,000 Da, perteneciente a una superfamilia con estas propiedades catalíticas que se divide en 8 subfamilias basado en la secuencia de aminoácidos y la similaridad

estructural de los sustratos. XDH pertenece a la subfamilia poliol deshidrogenasa (PDH) que incluye sorbitol deshidrogenasa y L-arabitol 4-deshidrogenasa de varios organismos. La mayoría de las PDHs catalizan la interconversión entre alcoholes y cetonas o aldehídos correspondientes, esto utilizando estrictamente NADH como cofactor.

Varios análisis cristalográficos de MDRs (Banfield et al., 2001) han revelado que el plegamiento de estas proteínas es muy similar, y que el cambio conformacional que sigue a la unión de su coenzima es un pliegue Rossman típico. Muchas MDRs tienen un átomo de zinc en el sitio catalítico que es necesario para la actividad enzimática. Algunas poseen un átomo de zinc adicional, conocido como átomo de zinc estructural. Se ha especulado su función como asistente para mantener la estructura cuaternaria de la proteína, sin embargo no existen estudios que confirmen esta función (Pauly et al., 2003).

El dominio de unión a coenzima posee una estructura β - α - β alrededor de una secuencia altamente conservada de Gly-X-Gly-X-X-Gly, en donde X puede ser cualquier aminoácido, que forma una curva cerrada al final de la primera cadena β y marca el inicio de la siguiente hélice α . La habilidad de la deshidrogenasa para discriminar entre NAD y NADP se encuentra en la secuencia de aminoácidos de la estructura β - α - β . El primer residuo determinante de la especificidad por NAD es un aspartato que forma dos puentes de hidrógeno con los dos grupos hidroxilo del ribosil e induce un potencial electrostático negativo al sitio de unión (Figura 5). En el caso contrario, si hubiera afinidad por NADP, este residuo de aspartato sería reemplazado por un aminoácido pequeño y sin carga como glicina, alanina o serina; acompañado

de un residuo de arginina que conforma un espacio positivamente cargado para el grupo fosfato (Watanabe et al., 2005). Gracias a esta configuración, la constante de afinidad para ambas coenzimas es considerablemente diferente. Para *P. stipitis* se reportó que la K_m para NAD es de 0.381 mM, mientras que para NADP es 170 mM.

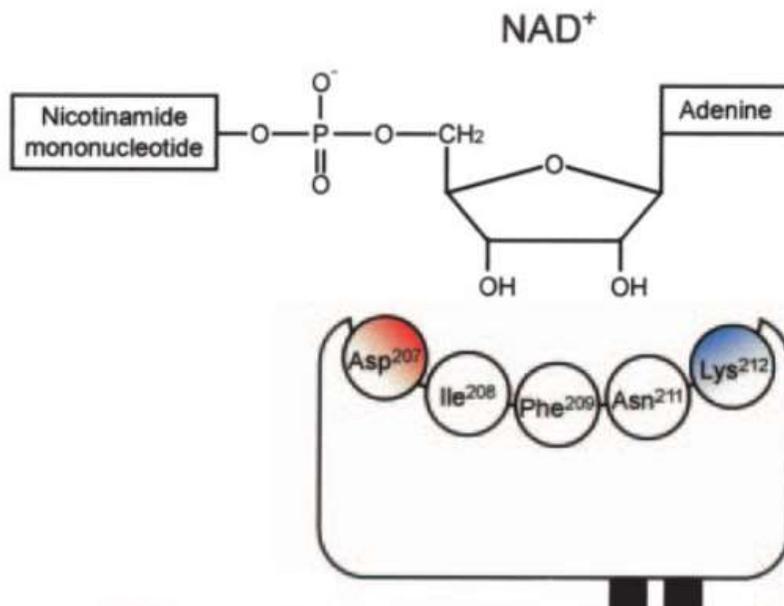


Figura 5. Aminoácidos que determinan la preferencia por NAD de XDH (Watanabe et al., 2005).

Es de suma importancia tomar en cuenta la preferencia de cofactores de XR y XDH, ya que al ser enzimas secuenciales lo ideal sería tener la misma preferencia de éstos para crear un flujo reconstituyente de moléculas reducidas/oxidadas para satisfacer las necesidades del estado redox de la célula y de esta manera mantener esta ruta metabólica activa.

Por otro lado la magnitud de las actividades enzimáticas de ambas enzimas es también un indicador de la eficacia de las levaduras para metabolizar xilosa, así como la relación entre ellas. De esta manera las actividades de XR y XDH que se han reportado son mayores en especies productoras de etanol que en las especies productoras de xilitol (Yablochkova et al., 2003).

II JUSTIFICACIÓN

Dadas las necesidades energéticas de nuestro país es necesario mejorar los procesos para la obtención del bioetanol, por lo que una de las estrategias es buscar cepas productoras de etanol a partir de sacarificados de residuos lignocelulósicos, así como el mejoramiento de éstas para la obtención de mejores rendimientos en procesos cada vez más redituables.

Cryptococcus humicola OJ-31 fue aislada de mostos de mezcal provenientes de Oaxaca y tiene la capacidad a diferencia de la mayoría de las levaduras utilizadas comúnmente, de asimilar pentosas tal como la xilosa. Esta capacidad es altamente deseada en los procesos para la obtención de etanol a partir de desechos lignocelulósicos.

El estudio de las enzimas así como de los genes involucrados en la fermentación de la xilosa por *Cryptococcus humicola*, permitirá comprender y dilucidar el metabolismo de esta cepa. Al identificar y comprobar la existencia de estos genes se pueden explicar los rendimientos que se obtienen y proponer mecanismos de mejora en la cepa.

III HIPÓTESIS

La xilosa reductasa y la xilitol deshidrogenasa son enzimas limitantes de la asimilación de xilosa en condiciones anaerobias en *Cryptococcus humicola* OJ-31 y se encuentran reguladas metabólicamente.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el comportamiento de la actividad enzimática de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa en *Cryptococcus humicola* OJ-31 al crecer en distintas condiciones de aireación y fuente de carbono.

4.2 Objetivos específicos

Determinar las condiciones de proceso (aireación y fuente de carbono) necesarias para la síntesis de las enzimas XR y XDH en *Cryptococcus humicola* OJ-31.

Cuantificar los niveles de expresión de los transcritos de los genes que codifican para XR y XDH en *C. humicola* OJ-31.

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos empleados y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se utilizó la levadura basidiomiceta *Cryptococcus humicola* aislada de mostos de mezcal, en Oaxaca y la cepa OJ-31, obtenida por mejoramiento de la cepa silvestre, con el agente mutagénico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) (Ocampo-Ortega, 2011). Las condiciones de crecimiento fueron 30 °C y 150 rpm en medios diferentes de acuerdo al objetivo de los ensayos.

5.2 Medios de cultivo

5.2.1 YPD

Composición en g/L: extracto de levadura 10; peptona 20; fuente de carbono 10.

5.2.2 YM

Composición en g/L: bactopectona 5; extracto de levadura 3; extracto de malta 3 y glucosa 10. El medio YMX posee la misma composición, pero con xilosa como fuente de carbono.

5.2.3 Breus

Composición en g/L: extracto de levadura 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 y glucosa 10 (Breus et al. 2012). El medio Breus-X posee la misma composición, a excepción de la fuente de carbono que es xilosa.

5.3 Preparación del inóculo

Se tomó una colonia de *C. humicola* OJ-31 para inocular un matraz de 250 mL conteniendo 50 mL del medio YM, se incubó durante 24 h a 30 °C y 150 rpm. Se tomó 10 % (v/v) de este preinóculo para inocular un segundo matraz con medio YM y se incubó bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se lavaron las células tres veces con agua destilada estéril y se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min y finalmente fueron resuspendidas en el volumen inicial de medio Breus.

5.4 Curva de crecimiento celular

Para la curva estándar de crecimiento en peso seco se hicieron 5 diluciones de un cultivo de 8 h en medio YPD, se midió DO a 600 nm y posteriormente se llevaron a peso constante una alícuota de cada una de las diluciones en una estufa al vacío a 80°C. La curva de crecimiento, en peso seco (g/L) versus DO 660 nm se hizo por duplicado.

5.5 Determinación de actividad enzimática

Obtención de extracto crudo: centrifugar 2 ml del cultivo a 8000 rpm por 10 min para recuperar las células, posteriormente se lavan 3 veces con agua estéril. Después se resuspende el botón celular en un tubo Eppendorf con 400 µL de regulador de fosfatos 0.1 M pH 7.2. Se congela el tubo a -20 °C por 30 min. Tras descongelar se agrega 0.3 g de arena de vidrio y 150 µL 2-mercaptoetanol 0.1M.

Agitar en vórtex por 30 min a máxima velocidad. Centrifugar a 10,000 rpm por 5 min y pasar el sobrenadante a otro tubo.

Determinación de actividad XR: se hace la mezcla de reacción en una celda de cuarzo y se lee la disminución de absorbancia dada por la oxidación del NADPH a 340 nm (espectrofotómetro Spectronic 21D) por 2 min. Mezcla de reacción (µL): regulador de fosfatos 0.1 M pH 7.2 – 600; agua estéril – 100; xilosa 0.1 M – 100; NADPH 1.15 mM – 100; extracto crudo – 100 (Cocotle-Ronzon et al. 2011).

Determinación de actividad de XDH: se hace la mezcla de reacción en una celda de cuarzo y se lee el aumento de absorbancia dado por la reducción del NAD a 340 nm (espectrofotómetro Spectronic 21D) por 2 min. Mezcla de reacción (µL): regulador TRIS-HCl 0.05 M pH 8.5 – 600; MgCl₂ 100 mM – 100; xilitol 40 mM – 100; NAD 1.15 mM – 100; y extracto crudo – 100.

Para el cálculo de ambas actividades se utiliza la siguiente ecuación):

$$Actividad\ enzimática = \frac{1000 \times Vt \times \frac{dA}{dt}}{\varepsilon \times v \times CF}$$

dA=absorbancia

dt= tiempo Vt=volumen total de la celda

v=volumen del extracto utilizado

ϵ = coeficiente de extinción molar de NADPH y NAD para un paso de luz de 1 cm (6.22 L/mmol)

CF= factor de concentración

U= unidad internacional que se entiende por la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de NADPH en un minuto para XR y la reducción de NAD en el caso de XDH.

5. 6 Cuantificación de proteína por Lowry-Folin

Se agregan 500 μ L de NaOH 1 N, 450 μ L de agua y 50 μ L de muestra en un tubo de ensayo. Llevar la mezcla a ebullición por 5 min y enfriar en baño de agua. Agregar 2.5 mL de reactivo C (50 mL de carbonato de sodio 5%, 1 mL de tartrato de sodio y potasio 2% y 1 ml de sulfato cúprico 1%). Reposar 10 min y agregar 50 μ L de reactivo de Folin (Sigma) 1 N y mezclar en vórtex. Esperar 30 min y leer absorbancia a 750 nm (espectrofotómetro Jenway 6320D). Se calculó la concentración con una curva patrón de solución de albúmina de suero bovino de 0 a 300 μ g (Lowry et al. 1951).

5.7 Cuantificación de azúcares reductores por DNS

En tubos de ensayo adicionar 400 μ L de agua destilada, 100 μ L de muestra de sobrenadante del cultivo y 1.5 mL del reactivo DNS. Llevar las muestras a ebullición en baño María por 5 min y enfriar en baño de agua. Después adicionar 3 mL de agua destilada y leer a 550 nm (espectrofotómetro JENWAY 6320D). La

concentración se calculó con curvas patrón realizadas con soluciones estándar de glucosa y xilosa de 0 a 500 μg (Miller, 1959).

5.8 Cuantificación de azúcares y productos en HPLC

Se inyectó 20 μL de muestra previamente diluída con agua (1:5) y filtrada a través de una membrana acrodisco (ϕ 1.3 cm, tamaño de poro 0.45 μm , PALL). Se utilizó una columna Hi-plex H+ (300mm x 7.7mm) (Agilent) a 65 °C. El método empleado fue isocrático con un detector de índice de refracción (IR) a 50 °C y como fase móvil se utilizó una solución de ácido sulfúrico a 5 mM con un flujo de 0.6 mL/min.

5.9 Extracción de RNA

A) Método de Collart & Olivero, (2001)

Se obtienen las células por centrifugación y después se resuspende el botón celular en 1 mL de agua fría y se pasa a un tubo Eppendorf. Centrifugar a 4°C y remover el sobrenadante. Resuspender en 400 μL de TES y 400 μL de fenol ácido. Agitar en vórtex por 10 s y posteriormente incubar de 30 a 60 min a 65 °C con agitación ocasional. Al finalizar la incubación enfriar en hielo por 5 min y centrifugar 5 min a máxima velocidad. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo (1.5) y añadir 400 μL de fenol ácido y agitar en vórtex vigorosamente. Enfríar y centrifugar como el paso anterior. Pasar la fase acuosa a un tubo nuevo y añadir 400 μL de cloroformo. Agitar vigorosamente en vórtex y volver a centrifugar. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y añadir 40 μL de acetato de sodio 3M pH 5.3 y 1 mL de etanol frío.

Finalmente centrifugar para obtener botón de RNA, resuspenderlo en 50 μ L de agua libre de nucleasas.

Composición de TES (mL): Tris pH 7.5 10mM 0.5, EDTA 10 mM 1, SDS 10% 2.5, agua libre de nucleasas 46.

B) Método de Sambrook & Russel (2006)

Se recuperan células a mitad de la fase exponencial por centrifugación. Resuspender el botón celular en 400 μ L de regulador AE y pasar a un tubo de 2 mL. Agregar 40 μ L de SDS 10%, 400 μ L de PCA y mezclar en vórtex, incubar en un baño metabólico 65°C por 10 min (mezclar una vez por minuto 5-10s). Posteriormente enfriar 5 min en hielo. Pasar la mezcla a un tubo y centrifugar a 14000 rpm/15 min y agregar 400 μ L de cloroformo; mezclar suavemente de forma manual. Centrifugar nuevamente y agregar otros 400 μ L de cloroformo y repetir el paso anterior. Pasar la fase acuosa a un tubo Eppendorf de 2 mL, agregar 50 μ L de NaOAC 3M pH 5.2 y aforar a 2 mL con etanol 100%. Tirar el sobrenadante y secar el botón de RNA al aire. Resuspender en 100 μ L de agua libre de RNAsas y agitar en vórtex. Mantener en frío y verificar que todo se resuspenda.

Composición de PCA: fenol pH 4.5, cloroformo grado BM y alcohol isoamílico grado BM en una proporción de 24:24:1 respectivamente.

Composición del regulador AE (mL): acetato de sodio 3 M pH 5.2 0.167, EDTA 0.5 M 0.2, agua libre de nucleasas 9.633,

C) Kit YeaStar RNA Kit (Zymo): se utilizó de acuerdo al manual

5.10 Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos

Montar la cámara de electroforesis (BioRad) y preparar un gel de agarosa al 1% con TAE y dejar gelificar. Cargar en los pozos 8 μl de regulador TAE 1%, 1 μl de muestra y 1 μl de reactivo para teñir (Amber DNA Fluorescent DNA Stain, Gel Company); cargar 1 μl del marcador de peso molecular (Extension Ladder 1 kb con una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en vez de muestra. Conectar la cámara a la fuente de poder y ajustar la corriente a 100 V, dejar correr por 30 o 40 min. El reactivo para teñir tiene 3 colorantes para seguir la migración de los ácidos nucleicos: azul de bromofenol, cianol FF xileno y naranja G; cuando este último llegue al extremo del gel parar la corriente. Revelar el gel en el fotodocumentador de geles (GelDoc de BioRad) con luz UV.

5.11 Síntesis de cDNA

Se utilizó el kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) de acuerdo al manual.

5.12 PCR punto final

Para comprobar la síntesis de cDNA a partir de los transcritos, así como para probar los oligonucleótidos diseñados para amplificar las secuencias pertenecientes a *xr* y *xdh*, se realizó una reacción de PCR punto final con los siguientes componentes de acuerdo a las recomendaciones en el kit de cDNA (μL): cDNA (dilución 1:1000) 2;

10x PCR regulador con MgCl 5; 10 mM dNTP 1; oligonucleótido directo 10 μ M 1.5; oligonucleótido reverso 10 μ M 1.5; Taq polimerasa 5 U/ μ L 0.5, agua 38.5.

Se utilizaron las siguientes condiciones para realizar la reacción: desnaturalización inicial de 30 s a 98 °C y 30 ciclos de 10 s de desnaturalización a 98 °C, 30 s de alineamiento a la T_m óptima (60°), 60 s de amplificación a 72 °C y finalmente una extensión final de 7 min a 72 °C.

5.13 PCR en tiempo real

Para realizar la cuantificación de los transcritos de los genes XR y XDH se utilizó el reactivo Luminaris HiGreen High Rox qPCR Master Mix (Thermo Fischer) de acuerdo a lo recomendado (μ L): Master mix 5x 5, oligonucleótido directo 10 μ M, oligonucleótido reverso 10 μ M, cDNA 1, y agua 3.4.

Se utilizaron las siguientes condiciones para realizar la reacción: pretratamiento con UDG (uracil-DNA glicosilasa) de 50 °C por 2 min, desnaturalización inicial de 10 min a 98 °C; y 40 ciclos de 10 s de desnaturalización a 98 °C, 1 min de alineamiento y extensión a la T_m óptima (58°), así como una curva de fusión.

Para realizar la cuantificación relativase utilizó el método comparativo de Ct, en donde *B-actina* fue el control interno y las condiciones fueron aerobiosis y anaerobiosis. El Ct se define como el número de ciclo en el que se detecta fluorescencia significativa por encima del umbral de detección del equipo utilizado para realizar qPCR. El método comparativo de Ct se calcula con la siguiente ecuación:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = [\langle Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ control} \rangle \text{ condición A} \\ - \langle Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ control} \rangle \text{ condición B}]$$

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación del tiempo adecuado para el crecimiento del inóculo

Cryptococcus humicola OJ-31 se hizo crecer en dos medios de cultivo: un medio mínimo (Breus) y un medio rico (YPD). Como se observa en la Figura 6, el crecimiento en ambos medios fue muy parecido hasta las 10 h con una velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación muy parecidas 0.2767 h^{-1} , 2.3 h para YPD y 0.3011 h^{-1} y 2.5 h para Breus respectivamente. Sin embargo después de este tiempo se observó mayor crecimiento en el medio YPD. Esto se puede deber a alguna limitación en algún componente en el medio mínimo ya que el medio YPD es mucho más rico por la alta cantidad de extracto de levadura, 20 veces más, que contiene, además de la peptona como fuente de nitrógeno, los minerales y vitaminas contenidos en el mismo. De esta cinética se determinó el tiempo de cultivo adecuado para obtener células a mitad de la fase exponencial de crecimiento bajo las mismas condiciones de cultivo y concentración celular inicial, por lo que los preinóculos para todos los ensayos se hicieron crecer por 8 h.

A pesar de que se obtuvo mayor crecimiento con el medio YPD, se escogió el medio mínimo para ser utilizado en los ensayos enzimáticos posteriores para evitar cualquier influencia de los otros componentes sobre la inducibilidad, además se buscó evitar cualquier interferencia en los métodos colorimétricos utilizados en los ensayos posteriores.

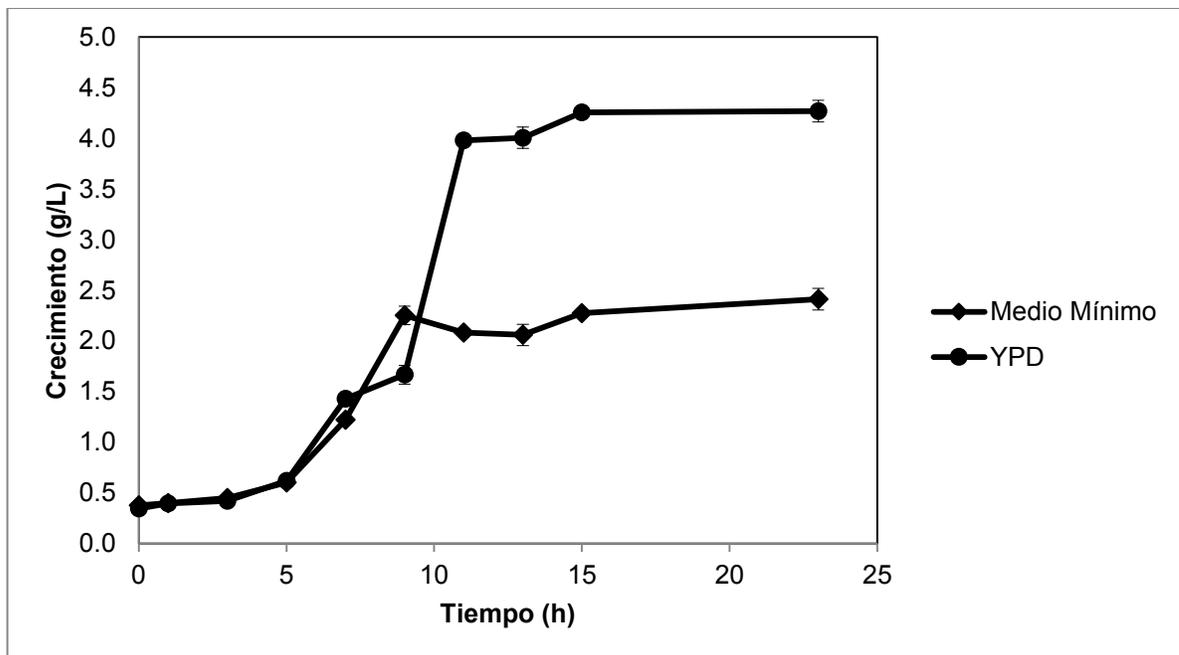


Figura 6. Cinéticas de crecimiento de *C. humicola* OJ-31 con medio YPD (●) y medio mínimo (◆).

6.2 Determinación de la actividad de XR y XDH

Con la finalidad de conocer el perfil de producción enzimática de XR y XDH, *C. humicola* OJ-31 se incubó en xilosa en condiciones anaerobias durante 24 horas. El experimento se realizó en condiciones anaerobias dado que el objetivo de este trabajo es estudiar la fermentación de la xilosa a etanol, por lo que se espera que bajo estas condiciones la levadura utilice esta fuente de carbono y por lo tanto la actividad de XR y XDH esté presente y se pueda cuantificar. Se decidió 24 h de incubación ya que no se conocía en qué tiempo se presentaría la actividad enzimática. En el caso de ambas enzimas se encontró un pico de actividad enzimática a las 8 h, después de este periodo se observó una disminución de la misma (Figura 7).

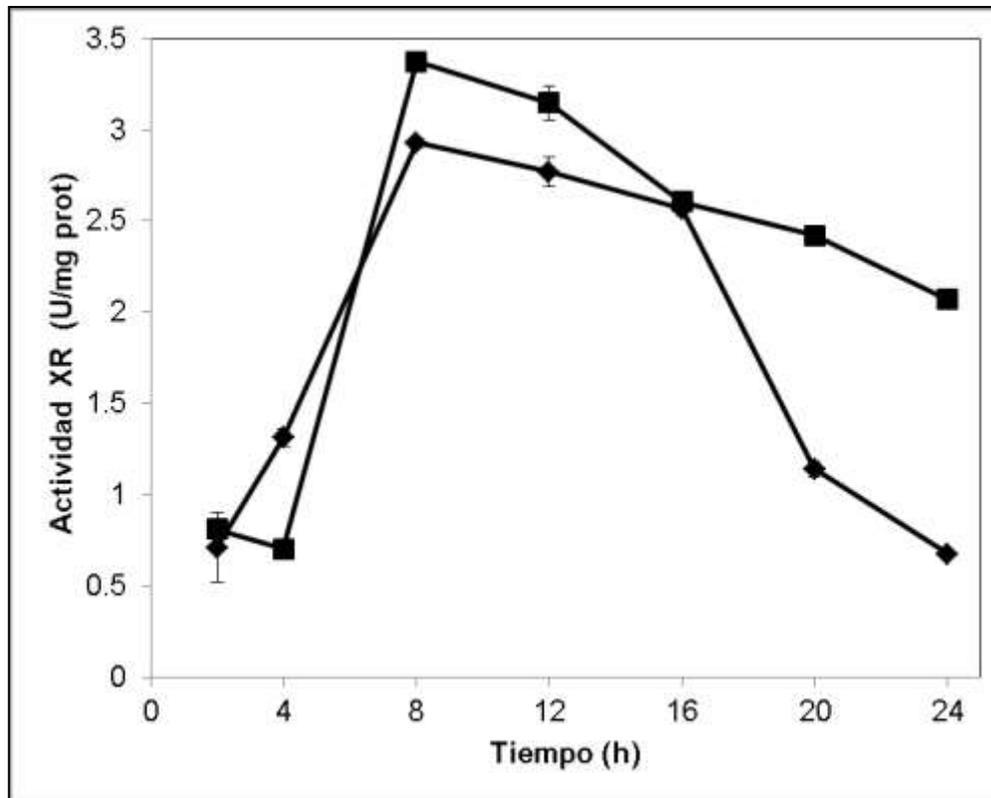


Figura 7. Actividad enzimática de XR (◆) y XDH (■) de *C. humicola* OJ-31 incubada en condiciones anaerobias en presencia de xilosa.

Por otro lado se dejó una muestra en condiciones aerobias y anaerobias hasta las 48 horas para comparar el consumo de xilosa y posible producción de xilitol y etanol. Se observó que a las 48 h en condiciones aerobias se consumió prácticamente toda la xilosa y se detectó una producción significativa de xilitol, 4.2 g/L. Mientras que en condiciones anaerobias se consumieron aproximadamente 5 de los 10 g/L de xilosa con los que se inició el cultivo, no se detectó etanol, pero sí xilitol (0.9 g/L) (Tabla 4).

Tabla 4. Consumo de xilosa y producción de xilitol por *C. humicola* OJ-31 en condiciones aerobias y anaerobias a 48 h.

Condiciones	Xilosa residual (g/L)	Xilitol (g/L)
aerobias	1.8	4.2
anaerobias	5.3	0.9

Dado que se encontró que el mayor consumo de xilosa y producción de xilitol fue en condiciones aerobias, *C. humicola* se hizo crecer en condiciones aerobias para observar la diferencia de actividad enzimática entre condiciones aerobias y anaerobias. Al igual que el experimento pasado se realizó en medio Breus-X durante 12 h, ya que como se observó anteriormente, después de este tiempo disminuye la actividad paulatinamente.

Como se observa en la Figura 8, se detectó mayor actividad de XR en condiciones anaerobias que en condiciones aerobias. De igual manera, en ambas condiciones se observó que a las 8 h existe un máximo de actividad, y que después de este tiempo disminuye. El pico de mayor actividad coincide con la fase exponencial de crecimiento determinada en la cinética de crecimiento en medio mínimo. Lo mismo ocurrió en el caso de XDH (Figura 9), que también mostró mayor actividad a las 8 h.

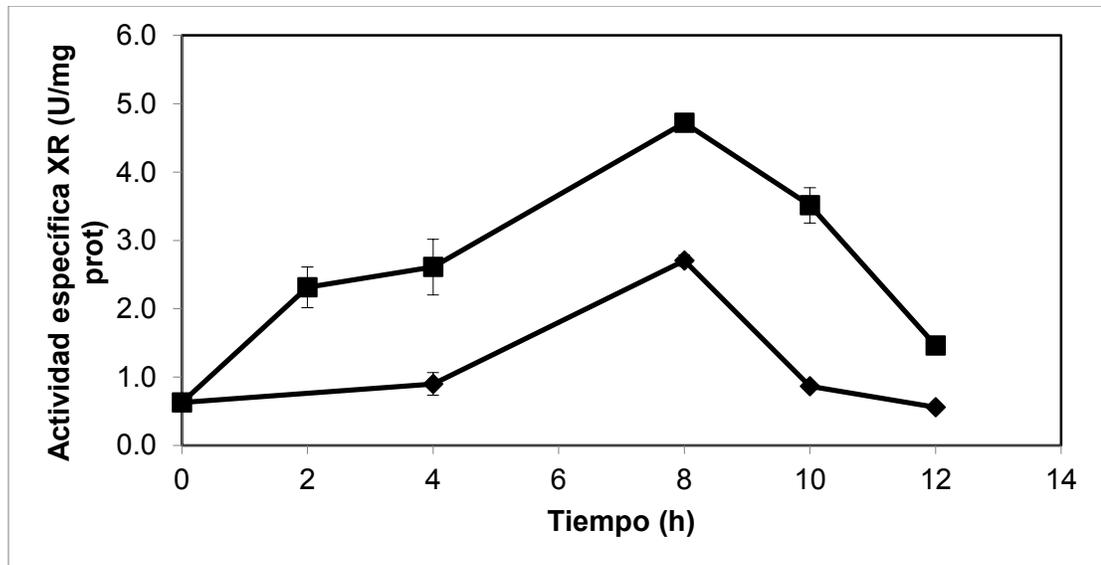


Figura 8. Actividad enzimática de XR de *C. humicola* OJ-31 en condiciones aerobias (◆) y anaerobias (■) en medio Breus-X por 12 h.

Para ambas enzimas se observó que la actividad va aumentando a medida de que transcurre el tiempo; esto podría indicar que XR y XDH posiblemente son inducibles por xilosa ya que el inóculo es crecido en un medio con glucosa. Esto se ha observado para diferentes enzimas que son inducidas por sustrato; las cinéticas muestran que en un inicio se detecta nula o poca actividad y a través del tiempo ésta va aumentando hasta llegar a un punto máximo donde se puede mantener; por ejemplo la enzima fúngica nitrato oxidasa (Cove, 1966).

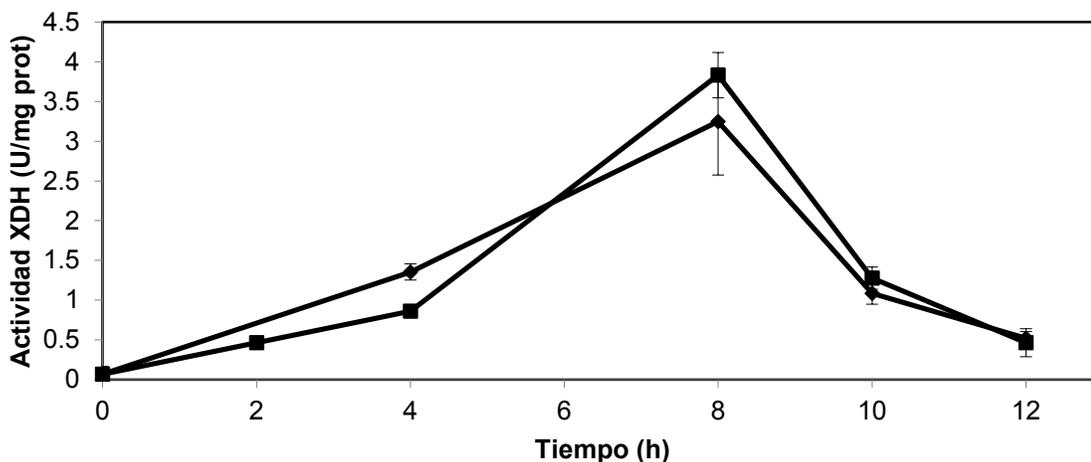


Figura 9. Actividad de XDH de *C. humicola* OJ-31 en condiciones aerobias (◆) y anaerobias (■) en medio Breus-X por 12 h.

6.3 Comparación de crecimiento y actividad enzimática de *C. humicola*- OJ31 en xilosa y glucosa

Una vez que se determinó la presencia de la actividad enzimática de XR y XDH en *C. humicola* OJ31, se hizo un seguimiento tanto de las actividades como del crecimiento en glucosa y xilosa en condiciones aerobias y anaerobias. Esto con el fin de relacionar la actividad de XR y XDH con el desarrollo de la levadura y observar la respuesta de las mismas en presencia de xilosa y glucosa.

Al crecer *C. humicola* en glucosa se obtuvo mayor cantidad de biomasa que al crecer en xilosa, pero se observó un patrón de crecimiento similar (Figura 10). Otro punto importante es el comportamiento en anaerobiosis (inducida después de 2 horas en aerobiosis), en el cual sí se observa un pequeño incremento de biomasa, aunque mucho menor que el observado en aerobiosis; nuevamente mayor en glucosa que en xilosa. Esto puede deberse a que aún quede oxígeno en el medio. Toivari et al.

(2001) reportaron que las condiciones microaerófilicas favorecen la fermentación de la xilosa a etanol en levaduras. Por esta razón, para los siguientes ensayos, se decidió no purgar por completo el oxígeno.

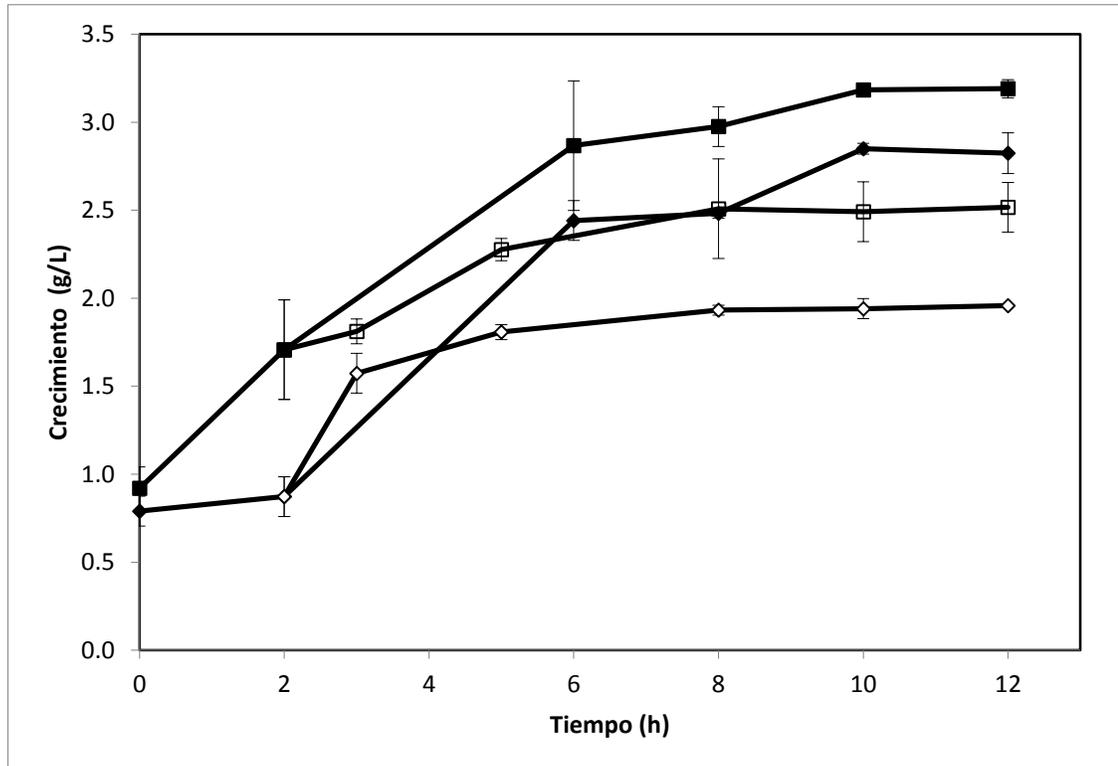


Figura 10. Crecimiento de *C. humicola* OJ-31 en xilosa aerobia (◆), glucosa aerobia (■), xilosa anaerobia (◇) y glucosa anaerobia (□).

Paralelamente se determinó la actividad enzimática de XR y XDH tomando muestra de los mismos cultivos de la cinética de crecimiento con xilosa y glucosa de *C. humicola* OJ-31. En el caso de los cultivos en xilosa se observó mayor actividad de XR y XDH en condiciones anaerobias que en aerobias (Figs. 11 y 12). Así mismo, se volvió a observar un valor de actividad máxima a las 8 h que se puede correlacionar con el crecimiento celular. Los valores obtenidos son diferentes a los ensayos

anteriores, sin embargo se mantienen en el mismo intervalo, los valores de actividades máximas no pasan de 5 U/mg.

En los cultivos en presencia de glucosa sí se detectó actividad de XR y XDH, aunque fue menor que las actividades detectadas en xilosa, y no se observó un aumento en la actividad relacionado con el tiempo o con el crecimiento; se mantiene a lo largo de la cinética. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en las cinéticas de *C. humicola* crecida en glucosa y xilosa (Figuras 11 y 12) así como las gráficas de actividad enzimática, se podría concluir que el aumento de actividad está ligado con el crecimiento celular, ambos llegando a un máximo a las 8 h; así como la relación en la disminución después de este tiempo con el inicio de la fase estacionaria.

Algo importante que resaltar es que los valores iniciales de actividad a tiempo cero, son diferentes entre glucosa y xilosa, por ejemplo: para XR se determinó 1.05 U/mg en glucosa y 0.28 U/mg en xilosa. Esto puede atribuirse a la poca biomasa, proveniente de 2 ml de medio de cultivo, que se recolectaron al inicio para realizar los ensayos. Para obtener el extracto libre de células es necesario realizar lisis celular, este rompimiento es muy variable cuando el botón celular recolectado es pequeño. Se ha observado que mientras menos biomasa se tiene, la lisis es menos homogénea lo que se traduce en lecturas muy variables en actividad enzimática entre réplicas biológicas así como una cantidad diferente de proteína intracelular, dando como resultado actividades específicas variables y desviaciones estándar altas .

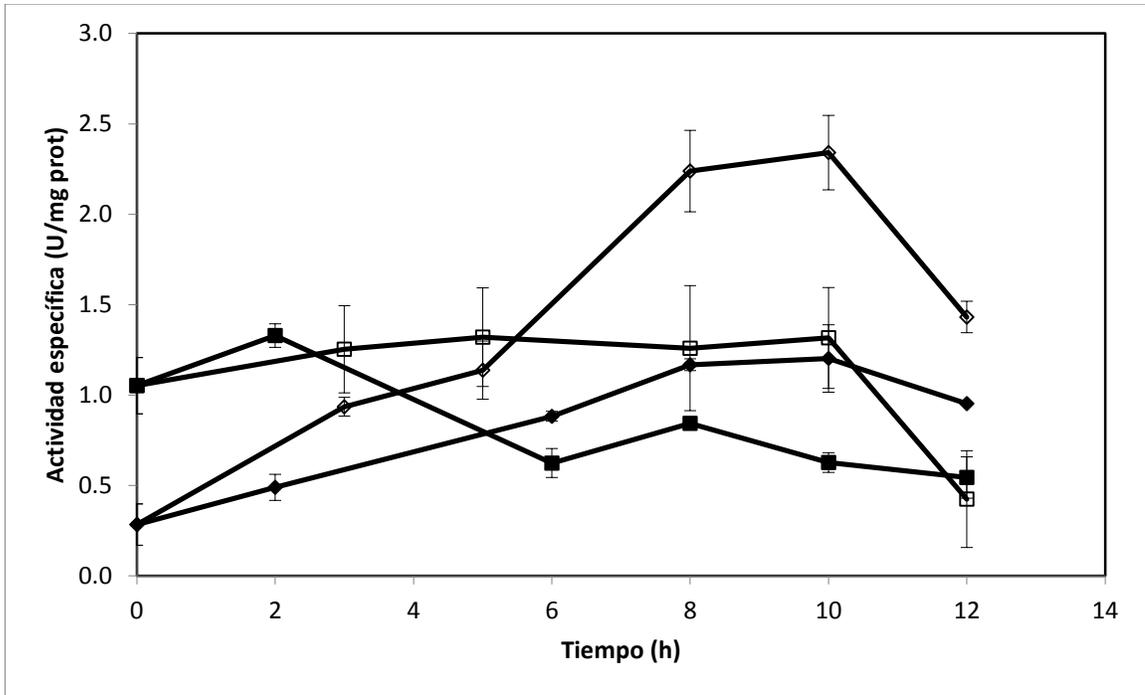


Figura 11. Actividad específica de XR de *C. humicola* OJ-31 cultivada en xilosa aerobia (◆), glucosa aerobia (■), xilosa anaerobia (◇) y glucosa anaerobia (□).

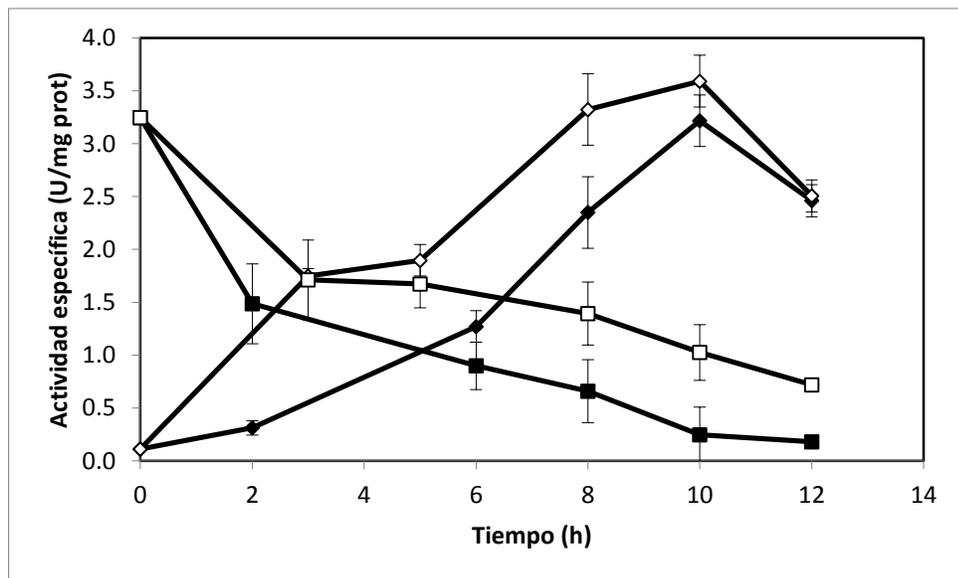


Figura 12. Actividad específica de XDH de *C. humicola* OJ-31 cultivada en xilosa aerobia (◆), glucosa aerobia (■), xilosa anaerobia (◇) y glucosa anaerobia (□).

Para intentar corregir la disparidad de actividad enzimática entre las muestras, especialmente en la primera muestra que es cuando se cuenta con menos biomasa, se tomó el doble de muestra; es decir, en vez de tomar 2 mL, se tomaron 4 mL de cultivo. El uso de un volumen mayor se vio reflejado en la obtención de actividades muy similares en el tiempo cero, además de que disminuyó la desviación estándar en el resto de las muestras como se observa en las Figuras 13 y 14. Este ensayo sirvió para observar una vez más los picos de actividad máxima para ambas enzimas a las 8 horas y la disminución después de este tiempo, así como una actividad mayor en condiciones anaerobias y en crecimiento con xilosa. Además de que se corroboró que la actividad enzimática de XR y XDH está ligada al crecimiento y no es residual o dependiente de la cantidad de biomasa utilizada en los ensayos. Lo anterior le confiere confianza y certeza a las técnicas de actividad enzimática utilizadas a lo largo de este proyecto.

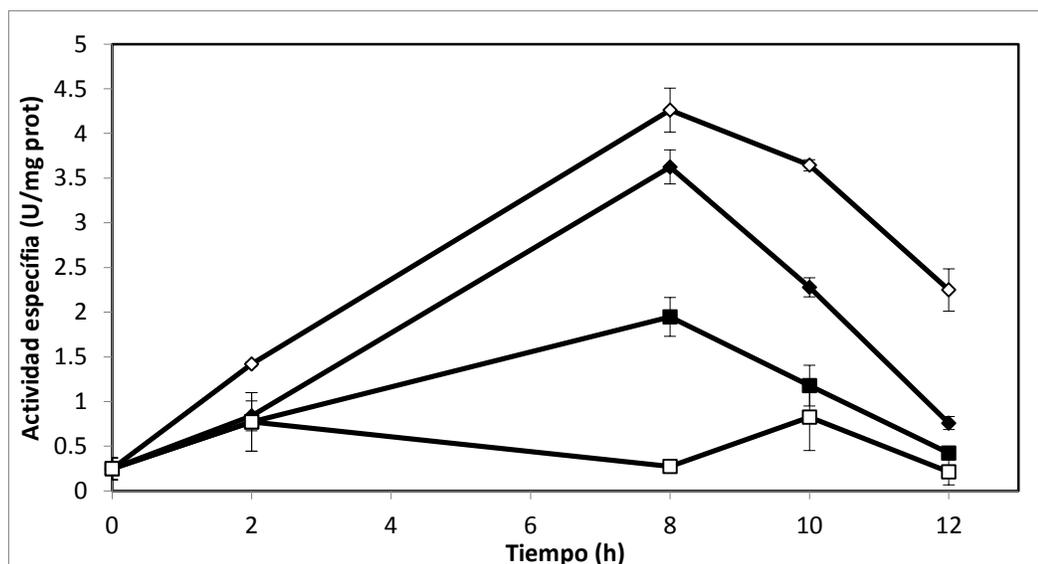


Figura 13. Actividad específica de XR de *C. humicola* OJ-31 cultivada en xilosa aerobia (◆), glucosa aerobia (■), xilosa anaerobia (◇) y glucosa anaerobia (□) (4 mL de muestra).

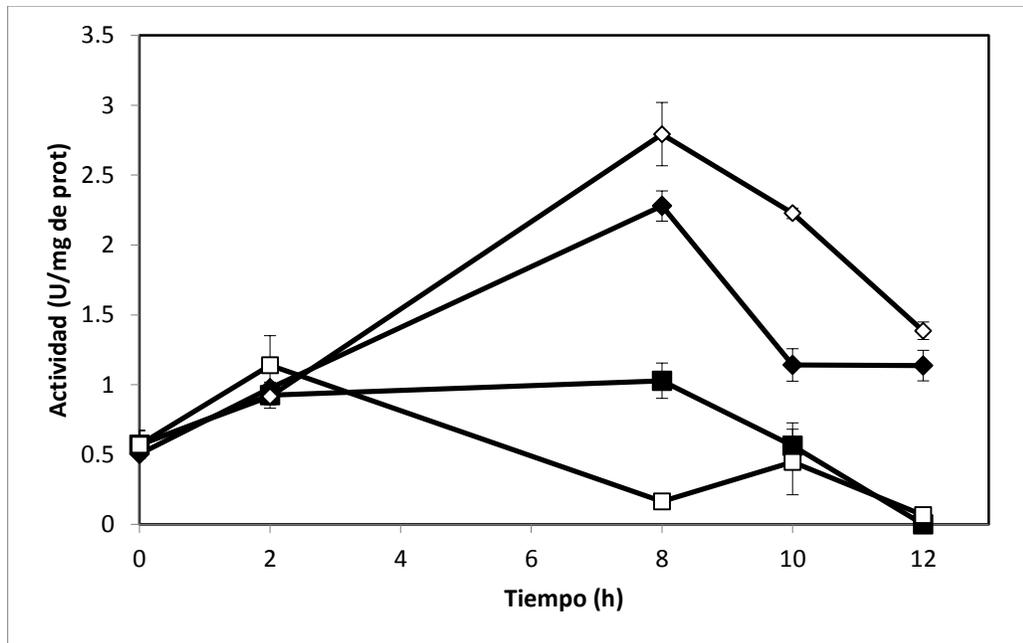


Figura 14. Actividad específica de XDH de *C. humicola* OJ-31 cultivada en xilosa aerobia (◆), glucosa aerobia (■), xilosa anaerobia (◇) y glucosa anaerobia (□) (4 mL de muestra).

A continuación se resumen los valores de las actividades enzimáticas de XR y XDH determinadas en diferentes condiciones, así como el consumo de xilosa y producción de xilitol. Para ambas enzimas los valores de actividad no son idénticos aunque se hayan realizado diferentes ensayos en las mismas condiciones. Estos valores se mantienen dentro del grupo 2 (Tabla 6) según la clasificación sugerida por Yablochkova et al. (2003), así como la relación entre la actividad entre XR y XDH, alrededor de 1:1. De acuerdo a esta clasificación, existen 3 grupos de levaduras en función de las actividades de XR y XDH. En el grupo 1 las actividades de ambas enzimas o son muy bajas, o la actividad de XR es mucho mayor que XDH; mientras que en el grupo 2 las actividades de XR y XDH no pasan de 5 U/mg proteína y tienen una relación cercana a 1:1. En esta tabla únicamente se encuentra *P. tannophilus*, sin embargo cualquier levadura cuyas enzimas XR y XDH tengan las características

antes mencionadas podrían clasificarse de esta manera. Finalmente en el grupo 3, la actividad de XDH es mayor que XR, y ambas actividades deben de ser mayores que en los grupos 1 y 2. Dadas las actividades presentadas por *C. humicola* OJ-31, esta levadura se encontraría en el grupo 2 y se espera que el consumo de xilosa no sea tan alto, así como la producción de xilitol y etanol. Para que una levadura logre una fermentación eficiente de la xilosa son necesarias dos condiciones: la primera que tenga una relación de actividad entre XR y XDH de 1:10 (Eliasson et al., 2001) y que XR tenga una preferencia por NADH, en vez de NADPH como es el caso de *P. stipitis* o *C. shehatae* (Yablochkova et al., 2003) las cuales son las levaduras con mejores rendimientos de etanol y menos producción de xilitol creciendo en xilosa.

Tabla 5. Actividad enzimática de XR y XDH de *C. humicola* OJ-31 en condiciones aerobias y anaerobias, así como consumo de xilosa y producción de xilitol en 12 h.

		Condiciones aerobias	Condiciones anaerobias
Actividad enzimática máxima (U/mg proteína)	Xilosa XR	3.62±0,18	4.26±0.24
	Xilosa XDH	2.34±0.10	3.32±0.22
	Glucosa XR	1.90±0.21	0.27±0.07
	Glucosa XDH	1.02±0.12	0.16±0.02
	Consumo xilosa	7.72 g/L	3.96 g/L
	Producción xilitol	2.54 g/L	1.53 g/L

Tabla 6. Actividades enzimáticas de XR y XDH en distintas levaduras.

	Géneros	Actividad específica (U/mg proteína)	
		XR	XDH
G1	<i>C. didensiae</i>	0.66	0.40
	<i>C. parapsilosis</i>	0.90	0.01
	<i>C. tropicalis</i>	6.43	1.16
	<i>K. marxianus</i>	0.16	<0.01
G2	<i>P. tannophilus</i>	3.45	4.16
G3	<i>P. stipitis</i>	4.84	10.37
	<i>C. shehatae</i>	8.23	13.95

(Yablochkova et al., 2003)

6.4 Actividad enzimática posterior al consumo de xilosa

Por otro lado, muestras de un cultivo de *C. humicola* OJ-31 durante 12 h en condiciones aeróbicas en xilosa se sometieron a anaerobiosis a diferencia del resto de las muestras que se pasan a esta condición después de 2 horas; una se mantuvo en los viales serológicos sellados por 12 h y otra por 60 h más. Esto se realizó para determinar si hay algún efecto tanto en actividad enzimática o en producción de xilitol una vez que se consumió al menos la mitad de la xilosa en el medio de cultivo de manera aerobia. La muestra que se dejó hasta alcanzar las 72 h fue para descartar fermentación alcohólica en un largo periodo por el lento consumo de la xilosa en condiciones anaerobias, y por lo tanto realizar los experimentos de fermentación por únicamente 12 horas no sea adecuado. En el caso de XR la actividad en condiciones aerobias sigue el mismo patrón ya observado y disminuyó en la fase estacionaria, sin embargo cuando se pasó a condiciones anaerobias aumentó nuevamente a casi el mismo valor observado a las 8 h (Figura 15).

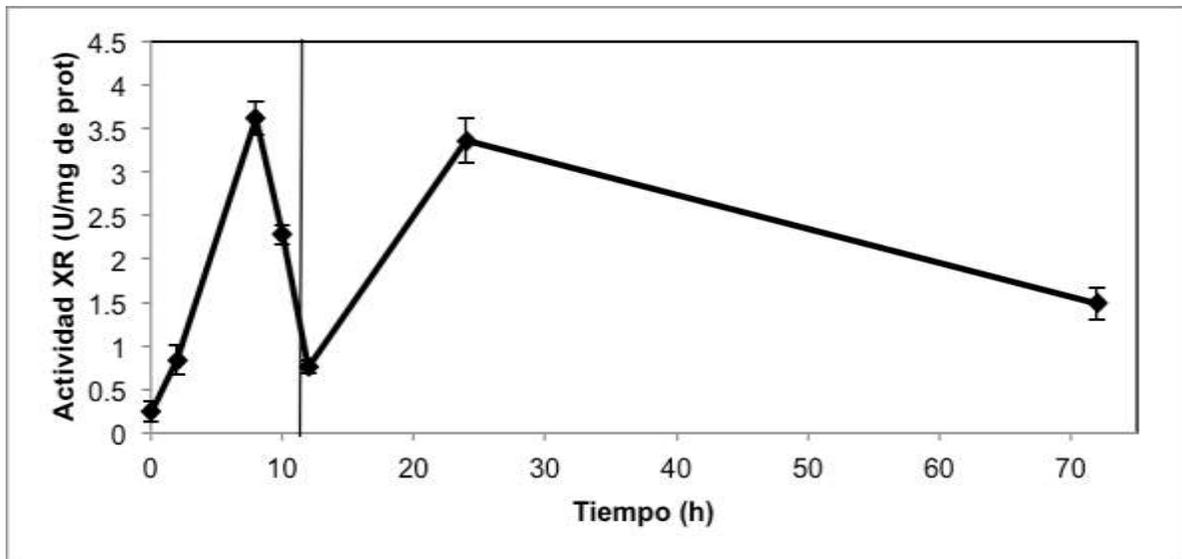


Figura 15. Actividad específica de XR de *C. humicola* OJ-31 en condiciones aerobias y anaerobias (la línea vertical indica el cambio a condiciones anaerobias).

Para el caso de XDH el aumento en actividad enzimática es más notorio que en XR, ya que después de 12 horas en anaerobiosis tiene una actividad mayor que la observada en el pico de las primeras 8 h en condiciones aerobias (Figura 16). Este comportamiento se puede explicar por la inducción por sustrato para esta enzima. Cuando se consume de manera aerobia la xilosa se tiene una acumulación de xilitol, al haber una concentración mayor de éste de forma intracelular, la célula responde posiblemente sintetizando más XDH observable en mayor actividad. De esta manera sería posible utilizar el xilitol para la obtención de energía.

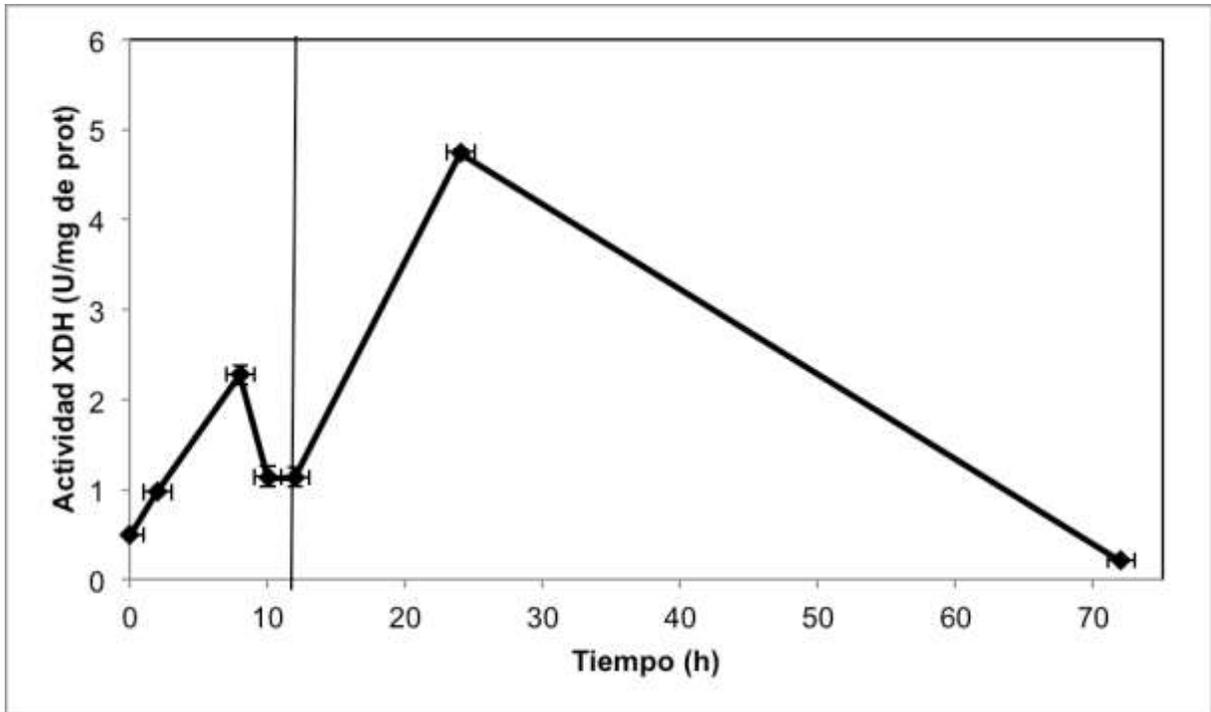


Figura 16. Actividad específica de XDH de *C. humicola* OJ-31 en condiciones aerobias y anaerobias (la línea vertical indica el cambio a condiciones anaerobias).

Al entrar en condiciones anaerobias el consumo de xilosa disminuye y prácticamente se para a pesar de que se presenta actividad de las dos enzimas necesarias para su asimilación (Figura 17).

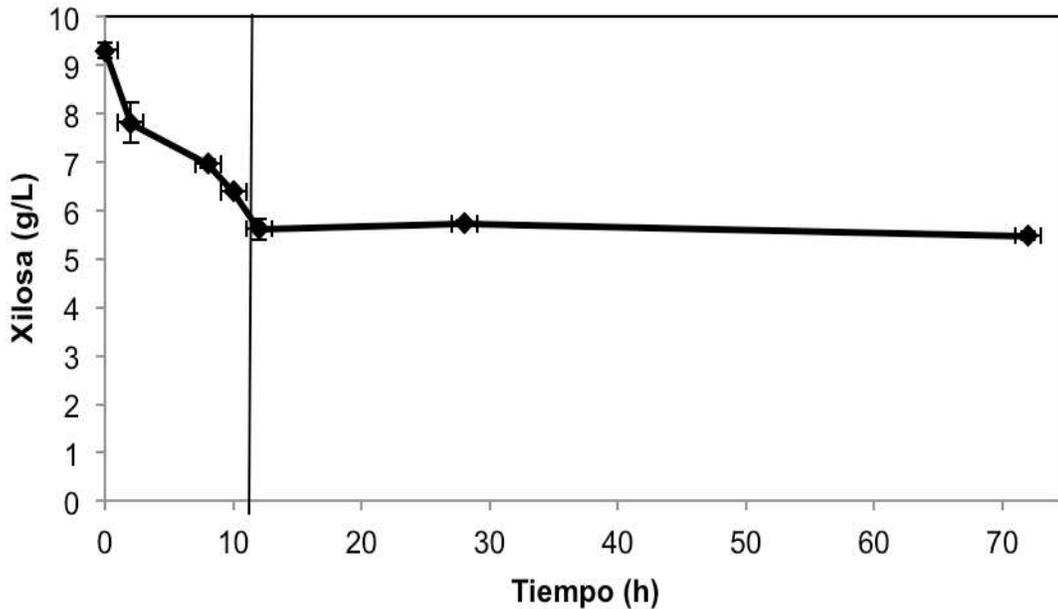


Figura 17 Consumo de xilosa de *C. humicola* OJ-31 en condiciones aerobias y anaerobias (la línea vertical indica el cambio a condiciones anaerobias).

Nuevamente se observó que a pesar de obtener actividades enzimáticas si no mayores a las obtenidas en condiciones aerobias pero sí equivalentes de XR y XDH; no se observó un consumo de xilosa correspondiente, y tampoco fermentación alcohólica en condiciones anaerobias. La posible razón de esto podría ser la diferencia en la preferencia de cofactores de ambas enzimas. Como se mencionó en la introducción, XR puede utilizar como cofactor NADH o NADPH aunque al utilizarse NADPH se tiene un complejo mucho más estable, mientras que XDH utiliza únicamente NAD. Esto provoca un desbalance en el estado redox de la célula en condiciones anaerobias (Nolleau et al. 1993). El estado redox es un término usado para describir la relación de la forma oxidada/reducida de una pareja redox en específico o en general de una célula. También es importante la capacidad reductora de un sistema que se refiere a que tan grande es la poza metabólica del sistema

redox particular. Por ejemplo, en el caso de los cofactores utilizados por estas enzimas se tiene que en células la relación de NADPH/NADP es de 100:1; mientras que para NADH/NAD es de 1:10 (Schafer et al., 2001). Esto es para mantener un equilibrio para lograr un poder reductor mayor. Por lo tanto si XR oxida el NADPH disponible, y XDH reduce el NAD, ese estado de equilibrio es perturbado y no existe manera de regresar al estado original. Esto sucede en condiciones anaerobias, pero no en condiciones aerobias ya que las dos fuentes de NADPH principales son de: a) la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP perteneciente al TCA, y b) la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa de la vía de las pentosas fosfato (Bruinenber et al., 1983); ambas rutas no utilizadas en ausencia de oxígeno. Para revertir este estado de exceso de equivalentes de reducción es necesaria la actividad de transhidrogenasas, enzimas que hasta el momento no han sido encontradas en levaduras (Harner et al., 2015).

Otra posibilidad sobre el lento metabolismo de la xilosa en condiciones anaerobias por *C. humicola* es el efecto Kluver, el cual se describe como la incapacidad de fermentar o metabolizar un azúcar de manera anaerobia aunque de manera aerobia sí es capaz de hacerlo (Sims & Barnett, 1978). Los rendimientos energéticos de la xilosa en comparación con la glucosa también pueden jugar un papel importante. El rendimiento teórico de formación de ATP para esta pentosa es de 1.67 mol ATP/mol xilosa fermentada, mientras que el de glucosa es 2.0 mol/mol. Esto significa que es necesario transportar más xilosa para mantener un nivel de formación de ATP comparable con el de la glucosa. El requerimiento de oxígeno puede indicar que no se está formando suficiente ATP. En el caso que se necesitara transportar más rápidamente la xilosa al interior de la célula para una producción de ATP equivalente

con glucosa, sería necesario un sistema de transporte eficaz. En algunas levaduras como *P. stipitis* no se ha encontrado algún sistema de transporte por difusión para xilosa, probablemente porque la ganancia energética por esta pentosa es muy pobre como para requerir un transporte activo; sin embargo en *S. cerevisiae* y *C. shehatae* sí se ha observado el uso de difusión facilitada para transportar xilosa bajo ciertas condiciones. Este tipo de sistemas de transporte tienen mayor afinidad por glucosa que por xilosa. Por otro lado el transporte activo de esta fuente de carbono por simporte activo es importante bajo condiciones de estrés por falta de nutrientes. Este mecanismo requiere que la célula se encuentre con suficiente energía para mantener un gradiente de pH para hacer funcionar el simporte. Por lo tanto el requerimiento de oxígeno también puede ser necesario para llevar a cabo fosforilación oxidativa y así poder realizar la exportación de protones para mantener el gradiente transmembranal de pH (McMillan, 1993).

6.5 Inducción por otras fuentes de carbono

Como ya se había observado la inducción de XR y XDH por xilosa y no por glucosa, se evaluaron otras fuentes de carbono como posibles inductores de estas enzimas. Se realizaron cultivos aerobios con diferentes carbohidratos simples y se observó que no sólo la xilosa es un inductor de actividad sino también otros compuestos. Como se observa en la Figura 18, el mayor inductor para ambas enzimas, además de la xilosa, fue la ribosa. La razón podría ser que la ribosa actúa como inductor ya que este compuesto es parte de la ruta de las pentosas fosfato: después de que se tiene la ribulosa, se convierte a ribosa y se incorpora a esta vía. Mientras que el

xilitol, contrariamente a lo esperado, sólo induce a XR y no a XDH. Lo anterior puede ser por el transporte ineficiente de éste al interior de la célula. Kern y colaboradores (1997) también encontraron que XDH de *C. tenuis* no es inducida por xilitol, probablemente por los pocos transportadores que existen para este poliol.

Por otro lado en los cultivos con arabinosa, una pentosa muy parecida estructuralmente a la xilosa, no se determinó actividad enzimática comparable con la actividad inducida por xilosa. Otras fuentes de carbono con las cuales se observó actividad mayor a la de la glucosa tanto para XR y XDH, es el glicerol, manosa y ramnosa. Mientras que con sorbitol y galactosa únicamente se observó actividad de XR. Dados los patrones diferentes de inducción por los azúcares probados se podría sugerir un control independiente de ambas enzimas, además de un control no coordinado como es el caso en *C. tenuis* y *P. tannophilus* (Bicho et al., 1988).

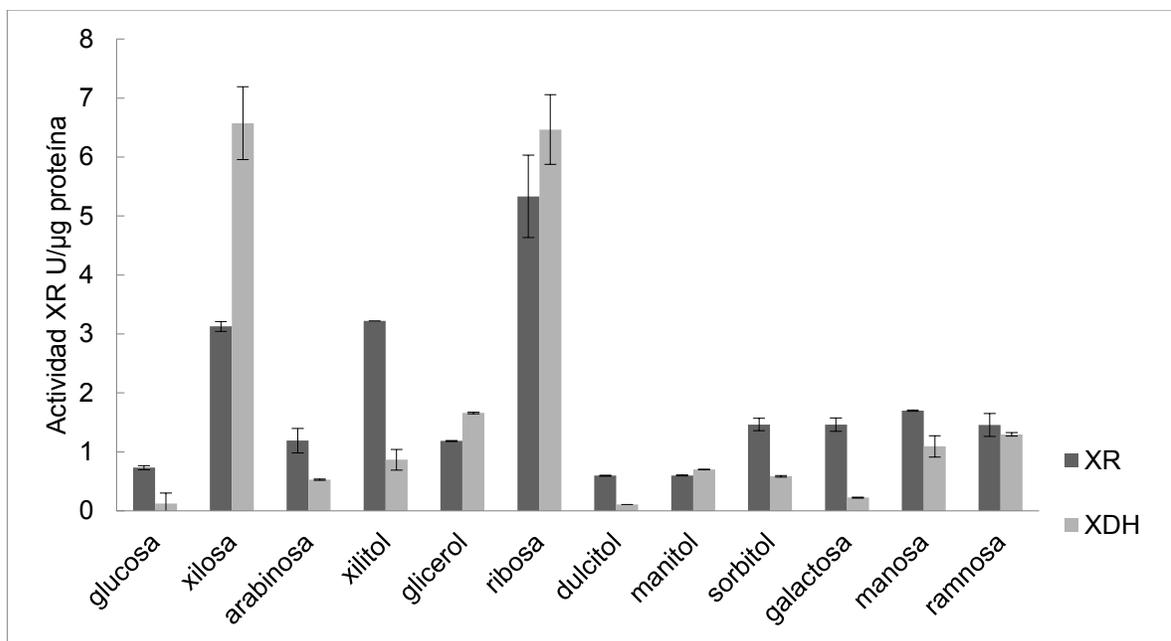


Figura 18. Inducción de actividad enzimática de XR y XDH de *C. humicola* OJ-31 en condiciones aerobias por diferentes fuentes de carbono (8 h).

6.6 Represión de XR y XDH por glucosa

Al encontrar niveles bajos de actividad con glucosa, se quiso determinar si esta hexosa únicamente no induce a XR y XDH, o también de alguna manera las reprime. Se tomó un pre inóculo crecido en xilosa, es decir con la actividad ya inducida y se pasó a un medio mínimo igualmente con xilosa y a las 3 h se suministró un pulso de glucosa (10 g/L). Como se observa en la Figura 19 se puede ver que a las 0 y 3 h las actividades enzimáticas están prácticamente iguales, y después del pulso de glucosa la actividad de XR se mantuvo prácticamente igual. Mientras que para XDH, sí incrementó la actividad, sin embargo en menor cantidad que en presencia únicamente de xilosa (Figura 19).

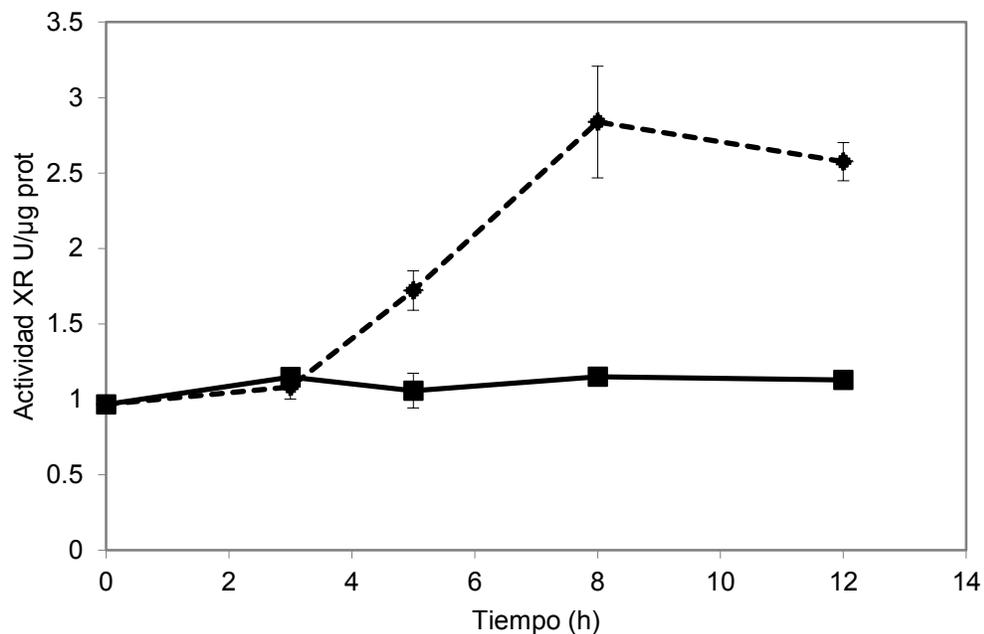


Figura 19. Efecto de la glucosa sobre la actividad de XR de *C. humicola* en condiciones aerobias, xilosa (◆), pulso de glucosa a las 3 h (■).

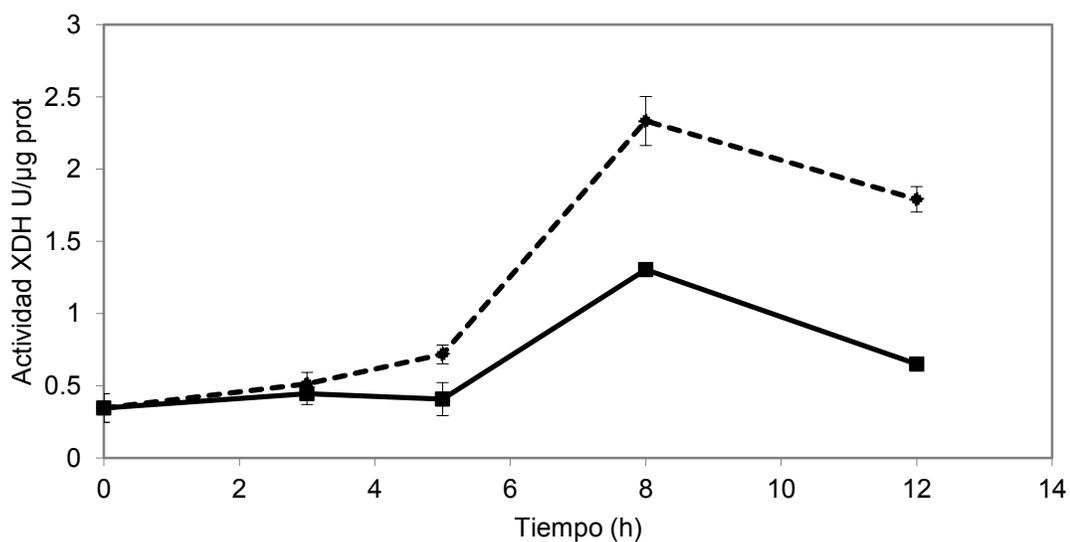


Figura 20. Efecto de la glucosa sobre la actividad de XDH de *C. humicola* OJ-31 en condiciones aerobias, xilosa (◆), pulso de glucosa a las 3 h (■).

Tomando en cuenta lo observado en la Figura 20, es posible que la glucosa sí actúe como un represor en la síntesis de estas enzimas, aunque se conserve una actividad basal. Como ya se había mencionado anteriormente, al parecer el control de estas enzimas no es coordinado ya que XDH parece un poco menos susceptible a la presencia de glucosa.

6. 7 Extracción de RNA

Para poder realizar los ensayos de qPCR fue necesario extraer RNA de *C. humicola* bajo diferentes condiciones y tiempos y así poder comparar la actividad enzimática de XR y XDH con la expresión de sus genes. Se probaron dos técnicas para la extracción de RNA donde se obtuvieron rendimientos aceptables aunque la calidad de RNA fue diferente. En la Tabla 7 se observa que con el protocolo B se obtuvo mayor concentración de ácidos nucleicos, mientras que la relación de absorbancia entre 260/280 está dentro de los intervalos de 1.8-2.2; indicador de que la muestra no está contaminada con fenol o proteínas. Visualmente en la muestra del protocolo B sí se logró distinguir el precipitado de ácidos nucleicos en el microtubo utilizado mientras que en la muestra A no se percibió.

Tabla 7. Extracción de RNA con dos protocolos.

Muestra	Concentración ng/ μ L	Relación A260:A280
A	269.75	2.125
B	854	2.09

A. Current Protocols in Molecular Biology

B. Cold Spring Harbor Lab Press

Se realizó una electroforesis no desnaturante en gel de agarosa para determinar la calidad e integridad del RNA extraído. Se pudo observar que en la muestra B la alta concentración determinada espectrofotométricamente se debía a la presencia de DNA genómico, mientras que la muestra A está compuesta únicamente de RNA (Figura 21). En ambos geles se observan claramente las bandas de 18s y 28 s de RNA ribosomal lo que indica que el RNA se extrajo de manera íntegra y no se degradó. En la técnica B se observan bandas muy claras de DNA genómico además del RNA, esto concuerda con la mayor concentración de ácidos nucleicos determinada espectrofotométricamente.

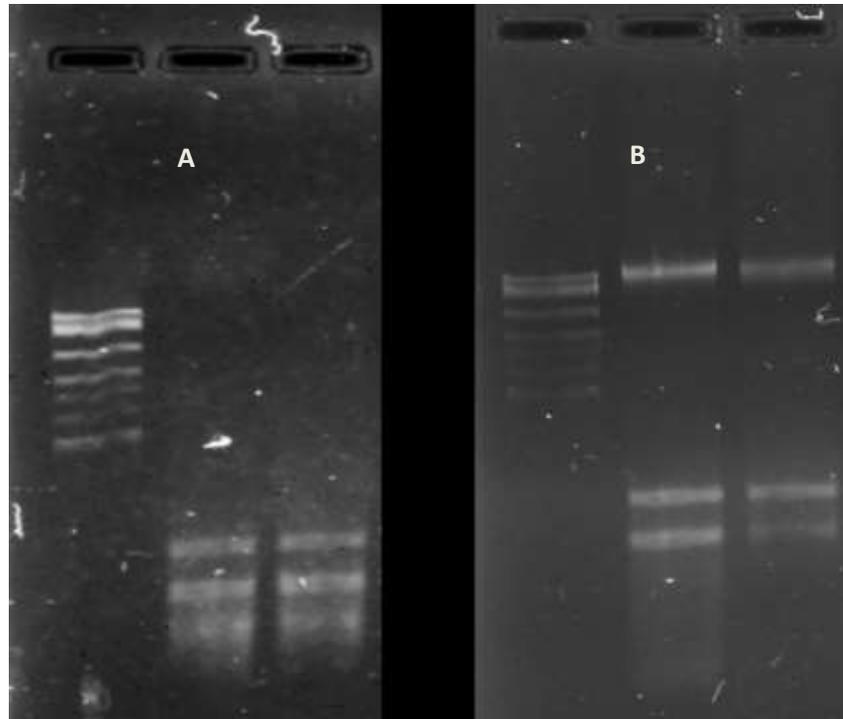


Figura 21. RNA de RNA de *C. humicola* OJ-31 extraído con técnicas A: Current Protocols in Molecular Biology, y B: Cold Spring Harbor Lab Press, teñido con Amber DNA Stain. Marcador molecular Extension Ladder 1 kb.

Además de las metodologías mencionadas anteriormente, también se probó un kit de extracción de RNA para levaduras del cual se obtuvo una concentración baja de RNA (8.4 ng/ μ L). Cuando se corrieron las muestras en el gel no se observó ningún tipo de banda, porbablemente por la baja concentración de ácidos nucleicos. En la Figura 22 se observan estas muestras, además de que el RNA obtenido de las otras metodologías también se corrió para comparar. Sin embargo, esta vez, ya no se distinguieron las bandas de 18 y 28 S características de un RNA degradado. Es muy probable que el RNA proveniente del protocolo A sea más propenso a degradación porque existe una mayor manipulación de las muestras que el proveniente del kit.

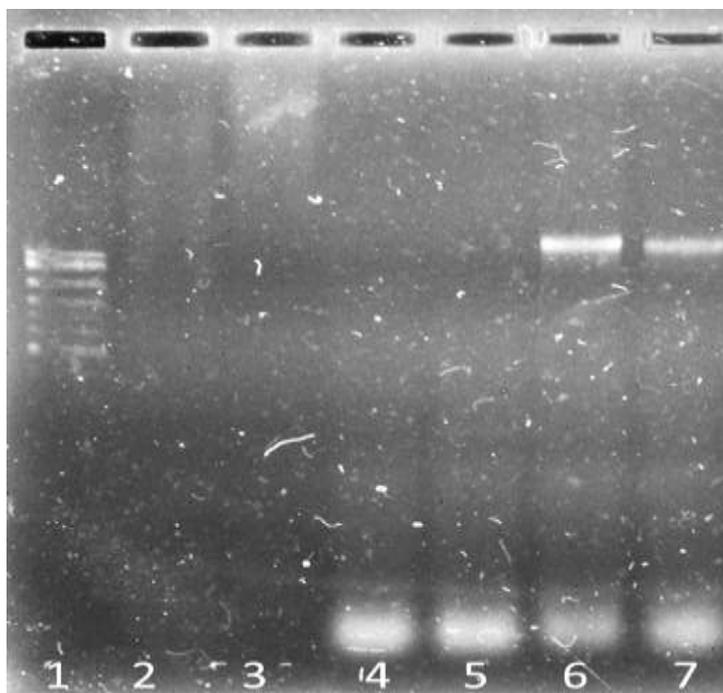


Figura 22. Comparación entre 3 protocolos de extracción de RNA de *C. humicola* OJ-31: carriles: 1, marcador de peso molecular; 2 y 3, extracción de RNA con kit Zymo Yeastar; 4 y 5, extracción de RNA con protocolo A (fenol ácido-cloroformo), 6 y 8, extracción de RNA con protocolo B (PCA).

6.8 Síntesis de cDNA para cuantificación de *xr* y *xdh*

Se realizó la síntesis de cDNA a partir de las diferentes muestras del RNA obtenido, para comprobar la integridad del mismo y probar los oligonucleótidos diseñados. A pesar de que no se pudo corroborar la calidad del RNA extraído con el kit, éste se utilizó en los ensayos para sintetizar cDNA además del obtenido por el protocolo A. Posteriormente se realizó una reacción de PCR punto final para comprobar que se realizó exitosamente la síntesis de cDNA. En la Figura 23 se observa que hubo amplificación con los oligonucleótidos para B-actina (carriles 3 y 4), el cual se usó como el gen control para los ensayos de qPCR, menos el carril 10 que es el control de GADPH incluido en el kit para sintetizar cDNA. Al utilizar hexámeros aleatorios

como cebadores no se sintetizó cDNA que pudiera ser utilizado como DNA molde para la reacción de PCR como se ve en los carriles 5, 6 y 7. Mientras que cuando se utilizan oligos (dT) sí se obtiene cDNA, además de que se tiene la certeza de que únicamente se sintetiza cDNA a partir de RNA mensajero por el residuo poliadenilado en el extremo 3' que aparea con las serie de timinas en este tipo de cebador. En los carriles 3 y 4 se observa una banda de amplificación, que son en los que se utilizó RNA extraído con el kit con 8.4 y 67.9 ng/ μ L. De acuerdo a estos resultados se observó que a pesar de que la transcriptasa reversa utilizada es muy sensible y capaz de sintetizar cDNA a partir de muy poca cantidad de RNA, únicamente amplificaron las muestras provenientes del RNA obtenido a partir del kit. La razón por la que probablemente no se observó una banda de amplificación utilizando el RNA proveniente del protocolo A, es la misma por la cual ya no se observaron bandas cuando se corrió únicamente del RNA. Por esta razón y a pesar de tener bajos rendimientos, se decidió utilizar el kit comercial para la extracción de RNA en vez del protocolo A. Otra conclusión que se puede obtener a partir de este ensayo es que los oligonucleótidos diseñados para B-actina sí amplificaron y por lo tanto pueden ser utilizados como control para las reacciones de qPCR posteriores.

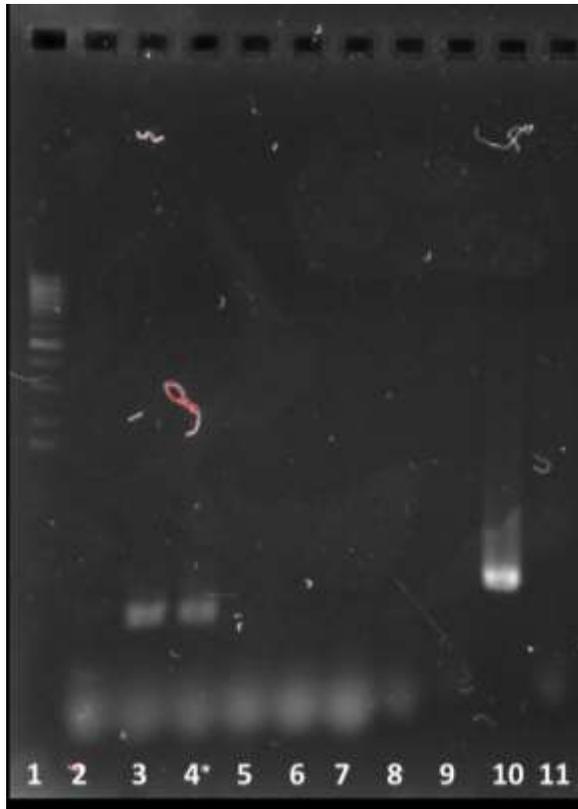


Figura 23. PCR punto final utilizando productos de síntesis de cDNA a partir de RNA extraído de *C. humicola* OJ-31 con kit RevertAid cDNA Synthesis utilizando oligonucleótidos para amplificar B-actina, carriles: 1 marcador molecular; 2 RNA molde obtenido con protocolo A (273.9 ng/μL) y utilizando como cebador oligo (dT); 3 RNA molde obtenido con kit YeaStar (8.4 ng/μL) cebador oligo (dT); 4 RNA molde obtenido con kit Yeastar (67.9 ng/μL) cebador oligo (dT); 5 RNA molde igual a 2 utilizando como cebador hexámeros aleatorios; 6 RNA molde igual a 3 cebador hexámeros aleatorios; 7 RNA molde igual a 4 cebador hexámeros aleatorios; 8 control sin transcriptasa reversa; 9 control sin RNA; 10 control de GADPH (RNA molde y oligonucleótidos incluidos en el kit para síntesis de cDNA); 11 control sin polimerasa.

6.9 Diseño de oligonucleótidos para *xr* y *xdh*

Para poder realizar una reacción de PCR es necesario contar con un par de oligonucleótidos, directo y reverso, específicos para amplificar el gen de interés. En este caso sólo es necesario amplificar un fragmento. El genoma de *C. humicola* no

está secuenciado, por lo que para diseñar los oligonucleótidos para *xr* y *xdh* se utilizaron secuencias de los genes de otras levaduras encontradas en la base de datos de Gene Bank. De estas secuencias se tomaron regiones conservadas para utilizarse como cebadores (Tabla 8).

Tabla 8. Secuencias utilizadas para diseñar oligonucleótidos para *xr* y *xdh*.

	Organismo	Número de referencia
XR	<i>Candida tenuis</i>	AF074484.1
	<i>Candida shehatae</i>	EF042296.1
	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	XM_001385144.1
XDH	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	HM769332.1
	<i>Pichia stipitis</i>	AF127801.1
	<i>Candida shehatae</i>	FJ040172.1

Los oligonucleótidos diseñados fueron los siguientes:

Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados para *actina*, *xr* y *xdh*.

Nombre	Secuencia (5'-3')
F-actina	TCTACAACGAATTGAGAGTTGC
R-actina	GACAAGATCTTCATCAAGTAGTC
F-XR	TCGGTTTTCGGCTGTTGG
R-XR	CCCAGTCCCATGGGTCG
F-XDH	AAAACCGGTATCTGTGG
R-XDH	GAACACTTGACAGCACC

Antes de poder realizar los ensayos de cuantificación de los transcritos de *xr* y *xdh* se realizaron pruebas de PCR en punto final para comprobar que los oligonucleótidos diseñados en efecto lograban amplificar los fragmentos deseados, además se realizaron una serie de pasos para optimizar la reacción en cuestión de temperatura, concentración de cDNA y oligonucleótidos. Como se muestra en la Figura 24 únicamente los oligonucleótidos de *xr* lograron amplificar ya que se observan bandas del tamaño esperado, mientras que en los carriles de *xdh*, sólo se alcanza a ver cierta dimerización de los cebadores.

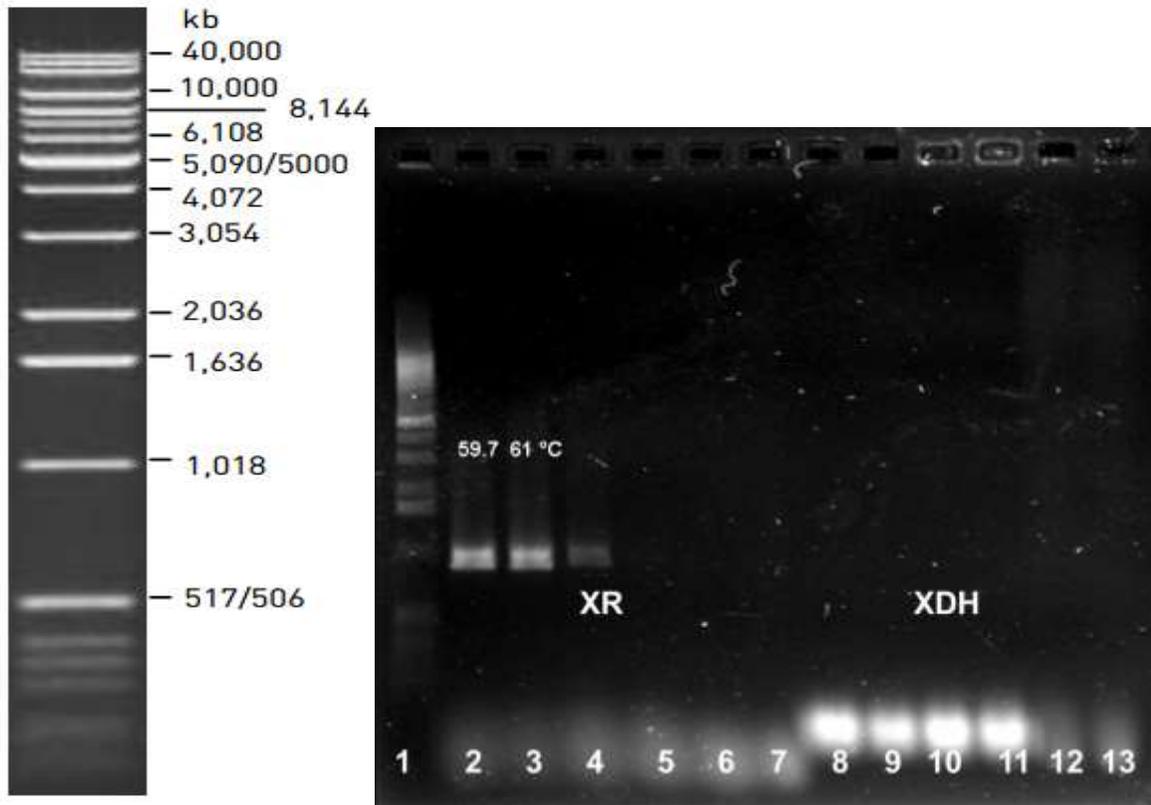


Figura 24. Gel de agarosa con productos de PCR, carriles: 1 marcador molecular; 2 al 7 XR en un gradiente de temperaturas; 8 al 13 XDH en un gradiente de temperaturas. Marcador molecular Extension Ladder 1k

Dado que no se observaron bandas de amplificación para *xdh*, se diseñaron otros pares de oligonucleótidos, no sólo de *xdh*, sino también de *xr* ya que lo ideal para qPCR son fragmentos cortos. En la Tabla 10 se muestran los otros pares de oligonucleótidos para *xr* y *xdh*.

Tabla 10. Segunda serie de oligonucleótidos para *xr* y *xdh*

Nombre	Secuencia (5'-3')
F-XR II	TCGACAACAAAACCTGTGCTGACC
R-XR II	CCAAAGCTTTTTCCACATTGTCAG
F-XR III	TTCTACTGTGGTGACGGTGACAACCTT
R-XR III	GGAATGTTGTCCCAGTCCCATGG
F-XR IV	CGGTTACAGATTGTTGACGGT
R-XR IV	TGGTTGTTGCAAGTATGGGTG
F-XDH II	CGCTTTGTCCAGGTAGGAAA
R-XDH II	GAGCTTTGTCTTTGCCGTTT
F-XDH III	GGTATCTGTGGTTCCGATATCCA
R-XDH III	TCTGGCAACTTGACCAAGAAGTC
F-XDH IV	CAAGCCCATGGTCATGGGCCAC
R-XDH IV	CATGTGAGGACACAAGTTGTAGT

Con los oligonucleótidos anteriores se obtuvieron amplificaciones de XR IV y XDH F-III y RIV (Figura 25). Dado que se utilizaron diferentes secuencias, el tamaño de los amplicones puede variar dependiendo el organismo, sin embargo las bandas

obtenidas concuerdan con la longitud esperada: B-actina 268-295 pb, XR 514-520 pb, XDH 217-220 pb. Como se observaron bandas claras y únicas se procedió a utilizar esos oligonucleótidos para los ensayos de qPCR.

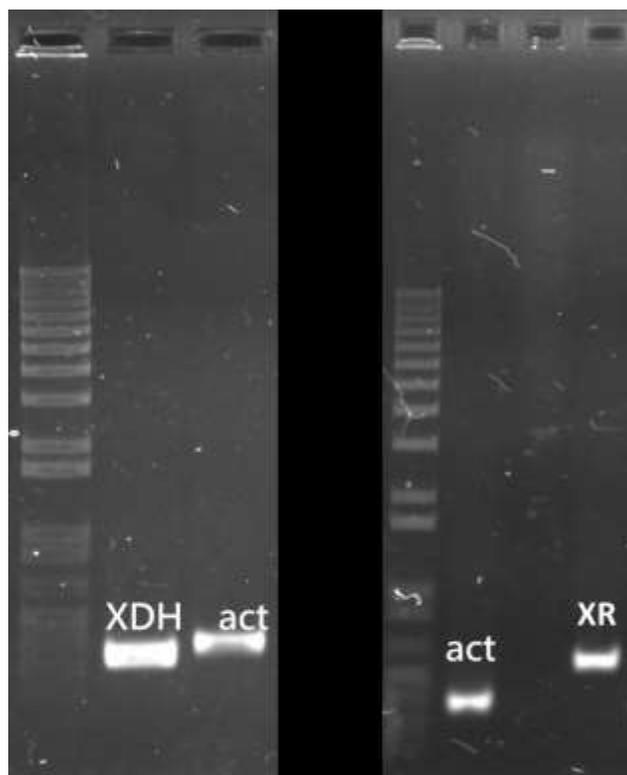


Figura 25. Productos de PCR utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de *C. humicola* OJ-31; oligos para *actina*, *xr* y *xdh*.

6.10 Cuantificación de transcritos para *xr* y *xdh* de *C. humicola* OJ-31

Se tomaron muestras de un cultivo de *C. humicola* OJ-31 bajo las mismas condiciones utilizadas para determinar actividad enzimática, utilizando como fuente de carbono xilosa. Los tiempos de muestreo fueron a las 0, 8 y 12 h en condiciones aerobias, 8 y 12 h en condiciones anaerobias. Para normalizar las muestras se tomó el mismo volumen para recolectar biomasa (4 mL), se realizaron diluciones del RNA

para llegar a una concentración de 100 ng/ μ L, y después de sintetizar el cDNA también se llevaron las muestras a esta misma concentración.

Se utilizó el kit de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, sin embargo tras una serie de ensayos no se logró ninguna amplificación. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa y se confirmó que no se logró la reacción al no verse ningún tipo de bandas. Para comprobar que el cDNA se encontraba en buenas condiciones se realizaron reacciones en punto final con las mismas muestras y oligonucleótidos para *actina* y *xdh*, únicamente cambiando los reactivos. En la Figura 26 se observa que sí hubo amplificación en las reacciones con los reactivos para punto final, mientras que aquellas con Syber Green no amplificaron. Con esto se descartó que el cDNA o los oligonucleótidos se hubieran degradado.

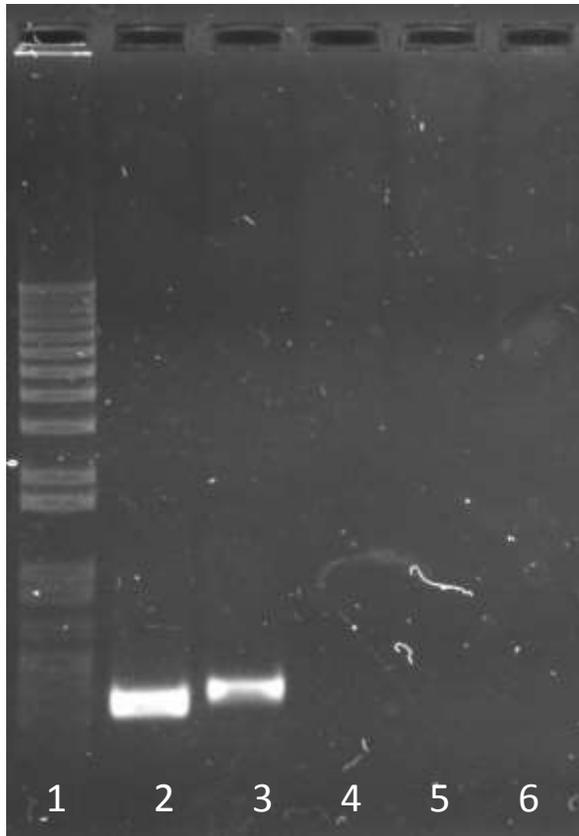


Figura 26. Gel de agarosa con muestras de reacción de PCR, carriles: 1 marcador molecular; 2 y 3 *-actina* y *xdh* con reactivos para punto final; 4 y 5 *actina* y *xdh* con reactivos para qPCR; 6 control sin enzima.

Posteriormente se probó con un programa de dos temperaturas en vez de tres, es decir 10 s a 95 °C de desnaturalización y 1 min a 60 °C de apareamiento y extensión. Además se probó también con cDNA a partir de RNA sintético y los oligonucleótidos para GADPH incluidos en el kit para síntesis de cDNA como control externo. Al correr el gel se observó una banda muy tenue de este último, y de las muestras no se observó nada (imagen no mostrada). Por esta razón se realizaron ensayos a diferentes temperaturas con el ciclo de dos etapas. En la Figura 27 se observa que a

58 °C sí amplificaron los fragmentos por lo que se procedió a realizar los ensayos en el equipo para PCR tiempo real.

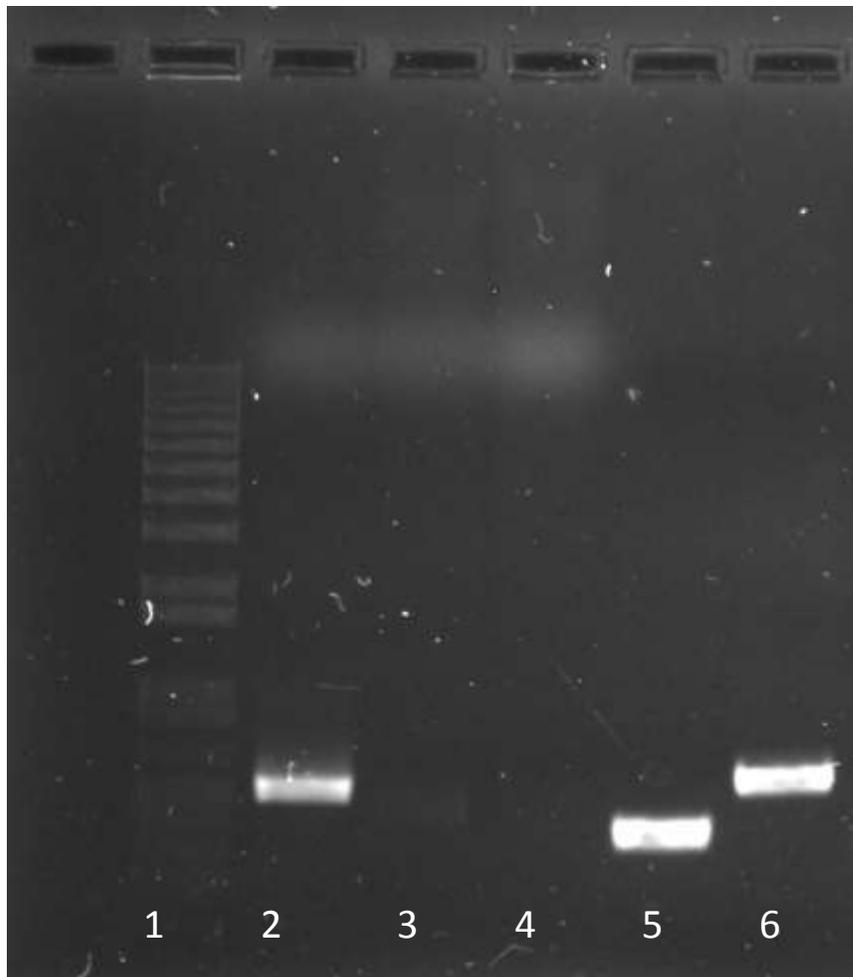


Figura 27. Gel de agarosa con productos de PCR, carriles: 1 marcador molecular, 2 control + GADPH, 3 control *-actina* con ciclo 3 etapas, 4 Control – sin templado, 5 *actina*, 6, *xr*.

Una vez que se realizó la reacción de qPCR se obtuvieron los valores de Ct con lo que se realizó una cuantificación relativa con el Método de Comparación de Ct. De los valores intervalos obtenidos con este método se puede observar que las condiciones de anaerobiosis sí tienen un efecto en la expresión de los genes. El

tener un valor de 1 al tiempo cero, significa que a ese tiempo no hay ninguna diferencia en la expresión de los genes *xr* y *xdh* dado que fueron las mismas muestras. Por otro lado, al comparar a las 8 h de aerobiosis y anaerobiosis sí se observa una diferencia en el cambio de expresión en ambos genes. En condiciones anaerobias a las 8 h el gen que codifica para XR se expresa de 1.7 a 2.5 veces más que en condiciones aerobias; mientras que para XDH se expresa de 1.66 a 2.57 veces más. Esto concuerda con la actividad enzimática encontrada en el mismo ensayo, la cual es ligeramente mayor para XR y XDH en condiciones anaerobias (Tabla 11).

Tabla 11. Expresión de los genes *xr* y *xdh* en condiciones aerobias y anaerobias.

Gen	Muestra (h)	Veces expresado
XR	0	1.00
	8	2.13
	12	7.79
XDH	0	1.00
	8	2.12
	12	1.52

Al realizar una comparación en la expresión durante el tiempo de cultivo en presencia de xilosa, se observó una gran diferencia en la expresión de *xr* y *xdh*. En la Tabla 12

se observan los valores obtenidos con el Método de Comparación de Ct entre los diferentes tiempos, la expresión es mucho mayor a las 8 y 12 h que al iniciar el cultivo. Se observó un claro efecto de la xilosa en la transcripción de los genes necesarios para su asimilación.

Tabla 12. Comparación de la expresión de los genes *xr* y *xdh* en condiciones aerobias.

Gen	Muestra (h)	Veces expresado
XR	0	1.00
	8	15.30
	12	9.87
XDH	0	1.00
	8	11.68
	12	9.70

Para que sea significativo el número de veces que un gen se expresa con respecto a otro, este valor debe ser mayor a dos (Leser et al., 2006). Por lo anterior se observó una inducción muy pequeña tanto para XR como para XDH en ausencia de oxígeno. Mientras que al comparar los niveles de expresión entre las 0 y 8 h y 0 y 12 h realmente se observó una inducción por la xilosa ya que se tuvieron valores mucho mayores de 2. En cinéticas de 12 h aerobias con xilosa como fuente de carbono se

encontró que las actividades de XR y XDH aumentan con el tiempo y en relación al crecimiento. Esto sugiere que hay una inducción en la expresión de estas enzimas en presencia de xilosa. Aunque fue menor en XDH que en XR, ya que como se ha observado en otros ensayos, esta enzima puede ser menos sensible a la inducción o represión y tenga un control independiente a XR. Park et al., (2010) reportaron que la xilosa también induce la expresión de XR y XDH en *P. stipitis*; mientras que la glucosa no lo hizo, es decir los niveles de expresión de estas enzimas no cambiaron en cultivos con esta fuente de carbono durante los experimentos de 48 h. Se observó que en *P. stipitis* al igual que en *C. humicola*, los patrones de inducción son diferentes entre estas enzimas a través del tiempo en cultivos con xilosa. Parece ser que el gen *xres* es el gen que es más sensible a inducción por la pentosa, mientras que la expresión de XDH varió menos, lo mismo se observó en la presencia de xilitol. Esto concuerda también con lo observado en el ensayo de actividad enzimática con diferentes sustratos realizado en este proyecto.

Durante el desarrollo del presente trabajo, se llevó a cabo la secuenciación de la región ITS por la empresa MacroGen (Corea) de la cepa utilizada y se encontró que la levadura corresponde a *Clavispora lusitaniae*. Por cuestiones prácticas no se cambió el nombre del microorganismo en este documento, sin embargo se revisó la literatura y ninguno de los resultados obtenidos se contraponen con lo reportado en este trabajo.

VII. CONCLUSIÓN

C. humicola OJ-31 asimila y crece en xilosa como fuente de carbono bajo condiciones aerobias. Mientras que en condiciones anaerobias esta levadura consume muy lentamente el sustrato acumulando xilitol y no etanol.

La actividad de XR de *C. humicola* OJ-31 es inducible por xilosa, xilitol y ribosa como sustrato, mientras que XDH es inducible con xilosa y ribosa.

En condiciones anaerobias *C. humicola* no es capaz de fermentar xilosa para producir etanol, a pesar de que presenta actividad enzimática de XR y XDH. La expresión de *xr* y *xdh* en estas condiciones es comparable con la expresión en condiciones aerobias.

XR y XDH además de ser inducibles por xilosa, son reprimibles por glucosa, ya que en su presencia se mantiene una actividad basal.

C. humicola es capaz de expresar los genes para XR y XDH tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

VII REFERENCIAS

Banfield, M. J., Salvucci, M. E., Baker, E. N., Smith, C. A. (2001). Crystal structure of the NADP (H)-dependent ketose reductase from *Bemisia argentifolii* at 2.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 306(2): 239-250.

Bajpai, P. (2013). *Advances in Bioethanol*. SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology, India.

Bicho, P. A., Runnals, P. L., Cunningham, J. D., Lee, H. (1988). Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(1): 50-54.

Breus, N. A., Ryazanova, L. P., Dmitriev, V. V, Kulakovskaya, T. V, Kulaev, I. S. (2012). Accumulation of phosphate and polyphosphate by *Cryptococcus humicola* and *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of nitrogen. *FEMS Yeast Research*, 12(6): 617–624

Bruinenberg, P. M., De Bot, P. H. M., Van Dijken, J. P. Scheffers, W. A. (1983). The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18(5): 287–292.

Cocotle-Ranzon, Y., Zendejas-Zaldo, M., López del Castillo-Lozano, M., Aguilar-Uscanga M. (2011). Preliminary characterization of xylose reductase partially purified by reversed micelles from *Candida tropicalis* IEC5-ITV, and indigenous xylitol-producing strain. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 2, 9-14.

Collart, M. A., & Oliviero, S. (2001). Preparation of yeast RNA. In *Current Protocols in Molecular Biology* (pp. 13.12.1-13.12.5).

CONAE. (2007). *Semblanza: Las energías renovables en México y el mundo*. Evans, C.T., Rafledge, C. (1984). Induction of xylulose-5-phosphate phosphoketolase in a variety of yeasts grown on D-xylose: the key to efficient xylose metabolism. *Archives of Microbiology*, 139(1): 48–52.

Cove, D. J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, 113(1): 51-56.

Eliasson, A., Hofmeyr, J. H. S., Pedler, S., Hahn-Hägerdal, B. (2001). The xylose reductase/xylitol dehydrogenase/xylulokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(4–5):288–297.

Fell J. W., Statzell-Tallman A. (1998) *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier, USA.

Hahn-Hägerdal B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidé, G., Zacchi, G. (2006). Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12): 549–556.

Hari Krishna, S., Janardhan Reddy, T., Chowdary, G. V. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*, 77(2): 193–196.

Harner, N. K., Wen, X., Bajwa, P. K., Austin, G. D., Ho, C., Habash, M. B., Lee, H. (2015). Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42: 1–20.

Himmel, M. E., Ding, S.Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315(5813): 804–807.

Jeffries, T.W. (1990). Fermentation of D-xylose and cellobiose. *Yeast: Biotechnology and Biocatalysis*. Verachert, H., De Mot, R., eds. New York: Marcel Dekker; pp. 349-394.

Jeppsson, M., Bengtsson, O., Franke, K., Lee, H., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M. F. (2006). The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher K_M for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(4): 665–673.

Kavanagh, K. L., Klimacek, M., Nidetzky, B., & Wilson, D. K. (2003). Structure of xylose reductase bound to NAD⁺ and the basis for single and dual co-substrate specificity in family 2 aldo-keto reductases. *The Biochemical Journal*, 373(Pt 2): 319–326.

Kern, M., Neuhauser, W., Haltrich, D., Kulbe, K. D., Nidetzky, B. (1997). Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS 4435. *FEMS Microbiology Letters*, 149: 31–37.

Leser, U., Naumann, F., Eckman, B., (2006). Data Integration in the life sciences. Springer LNCS Series: Lecture Notes in Bioinformatics, Vol 4075.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275.

Matsushika, A., Watanabe, S. (2008). Expression of protein engineered NADP + - dependent xylitol dehydrogenase increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81: 243–255.

Mcmillan, J. D. (1993). Xylose fermentation to ethanol: A Review. National Renewable Energy Laboratory-Midwest Research Institute. U. S. Department of Energy.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426–428.

Morais, C. G., Cadete, R. M., Uetanabaro, A. P. T., Rosa, L. H., Lachance, M. A., Rosa, C. A. (2013). D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two atlantic rainforest habitats in Brazil. *Fungal Genetics and Biology*, 60:19–28.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. (2004). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96: 673–686.

Nolleau, V., Delgenes, J. P., Navarro, J. M. (1993). Xylitol production from xylose by two yeast strains: sugar tolerance. *Current Microbiology*, 27:191–197.

Padilla, J. V., Sergio, H., Villar, C., Patricia, M., Coiffier, V., Colegio De La, E., Sur, F. (2011). The project of biofuels in Chiapas: Experiences of physic nut (*Jatropha curcas*) farmers within the rural crisis framework. *Estudios Sociales*, 19(38): 119–144.

Park, J.-Y., Woo Kang, H., Choi, G.-W., Chung, B.-W., Min, J. (2010). Specific expression patterns of xyl1, xyl2, and xyl3 in response to different sugars in *Pichia stipitis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(5): 946–949.

Pauly, T. A., Ekstrom, J. L., Beebe, D. A., Chrnyk, B., Cunningham, D., Griffor, M., Subashi, T. (2003). X-ray crystallographic and kinetic studies of human sorbitol dehydrogenase. *Structure*, 11(9): 1071-1085.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5: 53–63.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*.

Sánchez Cervantes, M. A., Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), (2012), Seminario de Divulgación: Energías Alternativas: El caso de los biocombustibles.

Schafer, F. Q., Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11): 1191–1212.

Secretaría de Energía (2009). Programa de Introducción de Bioenergéticos.

Secretaría de Energía (2013). Dictamen Técnico del Proyecto de Explotación Cantarell.

- Sims, A. P., Barnett, J. A. (1978). The requirement of oxygen for the utilization of maltose, cellobiose and D-galactose by certain anaerobically fermenting yeasts (Kluuyver effect). *Microbiology*, 106(2): 277-288.
- Stelte, W., Clemons, C., Holm, J. K., Ahrenfeldt, J., Henriksen, U. B., Sanadi, A. R. (2011). Fuel pellets from wheat straw: the effect of lignin glass transition and surface waxes on pelletizing properties. *Bioenergy Research*, 5(2): 450–458.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. *Bioresource Technology*, 83(1): 1–11.
- Takashima, M., Nakase, T. (1999). Molecular phylogeny of the genus *Cryptococcus* and related species based on the sequences of 18S rDNA and internal transcribed spacer regions. *Microbiology Culture Collection*, 15(2): 35-47.
- Takashima, M., Sugita, T., Shinoda, T., Nakase, T. (2001). Reclassification of the *Cryptococcus humicola* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6): 2199–2210.
- Toivari, M. H., Aristidou, A., Ruohonen, L., Penttilä, M. (2001). Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* : importance of xylulokinase (*XKS1*) and oxygen availability. *Metabolic Engineering*, 3(3):236–249.
- Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W. (1999). *Fundamentals of biochemistry* New York: Wiley, 492-525.
- Watanabe, S., Kodaki, T., Makino, K. (2005). Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11):10340–10349.
- Yablochkova, E. N., Bolotnikova, O. I., Mikhailova, N. P., Nemova, N. N., Ginak, A. I. (2003). The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. *Microbiology*, 72(4): 414–417.
- Yang B., Dai., Ding S., Wyman C. E., (2011). Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4): 421–449.