

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Mutagénesis, selección y  
caracterización nutricional de una  
cepa nativa de *Saccharomyces  
cerevisiae* para la producción de  
isobutanol**

**Juan Pablo Ortiz Rosas**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental  
Bogotá D.C., Colombia

2019



# **Mutagénesis, selección y caracterización nutricional de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de isobutanol**

**Juan Pablo Ortiz Rosas**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctor en Ingeniería Química**

Director:

Doctor Mario Enrique Velásquez Lozano

Línea de Investigación:

Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2019



*Dedicado a:*

*A mis padres: María Teresa y Paulino*

*A mis sobrinas: Estefanía y Marianna*

*A mis hermanas: Mónica y María Camila*

*A todos los que me han apoyado de corazón*



## **Agradecimientos**

Al Profesor Mario Enrique Velásquez Lozano, por permitirme trabajar con él y apoyarme en todo el proceso de formación doctoral.

A Juan Carlos Quitian Romero, Daniel Augusto Leal Moreno, Sebastián Ochoa Gómez, Richard Alonso Ruiz Merchán y Carlos Alberto Torres Cañizares, por apoyarme con su trabajo en las diferentes fases de la realización de la tesis.

A Yina Alejandra Cifuentes Triana, Margareth Andrea Patiño Lagos, Diana Carolina Tusso Pinzón, Jessica Natalia Torres Leiva, Yenny Paola Morales Cortes, Diana Milena Morales Fonseca, Carlos Rafael Castillo Saldarriaga, Felipe Andrés Guio Villareal, Iván Felipe Agudelo y Nicolás Correa Sepúlveda, por su apoyo tanto práctico como emocional para el desarrollo de la fase experimental de la tesis.

A los profesores Pedro Filipe de Brito Brandão, Carlos Yesid Soto y Juan Carlos Serrato Bermúdez por permitirme trabajar en los laboratorios a su cargo.

Al personal de los laboratorios de ingeniería química por su apoyo, especialmente a Ricardo Cortes.



## Resumen

Con el propósito de obtener una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con mayor producción de isobutanol durante el proceso de fermentación, se evaluó una colección de levaduras de esta especie y se seleccionó la cepa 209-2-8. Esta cepa produjo isobutanol en una concentración de 301.7 mg/L al emplear mieles de caña suplementadas con fosfato diácido de amonio como sustrato. Esta levadura fue sometida a un proceso de mutagénesis con N-metil N-nitro nitrosoguanidina, acoplado a la selección en un medio con sulfometuron metil. De este proceso se obtuvo la levadura *S. cerevisiae* Q1, la cual presentó una producción de isobutanol 1.92 veces mayor que la de la cepa parental alcanzando una concentración de 580.8 mg/L. La producción de alcohol isoamílico por parte de la cepa mutante fue 1.3 veces mayor respecto a la cepa parental. Posteriormente, mediante un proceso de mutagénesis con etil metano sulfonato y un enriquecimiento con nistatina se obtuvo la cepa Q1m que presenta auxotrofia para L-leucina. Esta cepa alcanzó una producción de isobutanol de 811.0 mg/L en mieles suplementadas con L-leucina, mientras redujo su producción de alcohol isoamílico. La productividad alcanzada fue de 16.4 mg/Lh, la cual fue determinada mediante una evaluación preliminar en biorreactor. Por otro lado, se realizó un diseño experimental Plackett-Burman, empleando un medio de referencia químicamente definido. Con este diseño se encontró que la concentración de fosfato diácido de potasio y la de biotina, y el nivel de pH son los factores que influyen la producción de isobutanol.

**Palabras clave:** isobutanol, *Saccharomyces cerevisiae*, mejoramiento de cepas, etanol, fermentación, caña de azúcar.

## Abstract

In this study, a collection of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* was evaluated in order to select a strain with an increased isobutanol production during the fermentation process. The strain 209-2-8 presented the higher isobutanol production, which was 301.7 mg/L, when a diluted sugar cane syrup supplemented with ammonium dihydrogen phosphate was used as substrate. Further, this yeast was subjected to a mutagenesis process with N-methyl N-nitro nitrosoguanidine, followed by a selection procedure with sulfometuron methyl. As a result, the *S. cerevisiae* strain Q1 was obtained, which presented an isobutanol production 1.92 fold higher than the parental strain, with a final concentration of isobutanol of 580.8 mg/L. Also, the production of isoamyl alcohol by the Q1 mutant strain was 1.3 fold higher than the parental strain. Subsequently, Q1 mutant strain was subjected to a mutagenesis process with ethyl methane sulphonate followed of an enrichment procedure with nystatin in order to obtain an L-leucine auxotrophic mutant (called Q1m). The strain Q1m reached an isobutanol production of 811.0 mg/L, when a diluted sugar cane syrup supplemented with ammonium dihydrogen phosphate and L-leucine was used as a substrate. This strain also produced a lower isoamyl alcohol level than the parental strain. Through a preliminary bioreactor assay, it was determined that the productivity was 16.4 mg/Lh. On the other hand, a Plackett-Burman experimental design was performed, by using as a reference a chemical defined media. Results showed that potassium dihydrogen phosphate, biotin and pH levels were the main factors that affects isobutanol production.

**Keywords:** isobutanol, *Saccharomyces cerevisiae*, strain improvement, ethanol, fermentation, sugar cane.

# Contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>X</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas .....</b>	<b>XVII</b>
<b>1. Marco teórico y estado del arte.....</b>	<b>5</b>
1.1 Generalidades del Isobutanol .....	5
1.2 Características generales de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	8
1.2.1 Ciclo de vida de la levadura <i>S. cerevisiae</i> .....	8
1.2.2 Características fisiológicas de la levadura durante los procesos de fermentación .....	10
1.3 Producción de alcoholes fusel durante la fermentación alcohólica .....	11
1.4 Producción de isobutanol empleando microorganismos recombinantes.....	15
1.5 Herramientas para el mejoramiento genético de microorganismos .....	20
1.5.1 Mutagénesis aleatoria y selección .....	20
1.5.2 Otras herramientas de mejoramiento genético para <i>S. cerevisiae</i> .....	23
1.6 Conclusiones.....	24
<b>2. Mutagénesis y selección de levaduras con mayor producción de isobutanol ....</b>	<b>27</b>
2.1 Materiales y métodos .....	29
2.1.1 Microorganismos empleados .....	29
2.1.2 Medios empleados .....	31
2.1.3 Procedimientos .....	32
2.1.4 Determinación del contenido de alcoholes y azúcares .....	37
2.2 Resultados y discusión .....	38
2.2.1 Perfil de producción de alcoholes de aislados naturales.....	38
2.2.2 Obtención y caracterización de la levadura 209-2-8 .....	42
2.2.3 Mutagénesis y selección de mutantes con resistencia a SM .....	51
2.2.4 Obtención de mutantes con auxotrofia para L-leucina.....	67
2.3 Conclusiones.....	73
<b>3. Efecto de la concentración de nutrientes y el nivel de pH sobre la producción de isobutanol.....</b>	<b>75</b>
3.1 Materiales y métodos .....	77
3.1.1 Determinación del contenido de alcoholes y azúcares .....	80
3.2 Resultados y discusión .....	80

3.3	Conclusiones.....	92
<b>4.</b>	<b>Evaluación preliminar de los mutantes en biorreactor empleando mieles de caña como sustrato .....</b>	<b>93</b>
4.1	Materiales y métodos .....	93
4.2	Resultados y discusión .....	97
4.3	Conclusión.....	105
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>107</b>
5.1	Conclusiones.....	107
5.2	Recomendaciones .....	111
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>135</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1</b> .Productos de la deshidratación del isobutanol .....	7
<b>Figura 1-2.</b> Ciclo de vida heterotático de la levadura <i>S. cerevisiae</i> .....	9
<b>Figura 1-3.</b> Catabolismo de L-leucina por la ruta de Ehrlich.....	12
<b>Figura 1-4.</b> Ruta para la biosíntesis de isobutanol a partir de glucosa para <i>S. cerevisiae</i> . .....	14
<b>Figura 2-1.</b> Esquema general de la investigación para la obtención del microorganismo. .....	29
<b>Figura 2-2</b> Producción de isobutanol por las cepas de levadura nativas. ....	40
<b>Figura 2-3</b> Producción de etanol por las cepas de levadura nativas.....	41
<b>Figura 2-4</b> Análisis de estabilidad que condujo a la obtención de la levadura <i>S. cerevisiae</i> 209-2-8.....	43
<b>Figura 2-5</b> Colonias de las levaduras <i>S. cerevisiae</i> 209-2 y 209-2-8 en agar YPD .....	46
<b>Figura 2-6</b> Levaduras a 40 X <i>S. cerevisiae</i> 209-2 y 209-2-8 en medio de esporulación. 46	46
<b>Figura 2-7</b> Caracterización del crecimiento de levaduras en fuentes de carbono no fermentables .....	47
<b>Figura 2-8</b> Gel de electroforesis para determinación de presencia de regiones MAT $\alpha$ y MAT $\alpha$ en levaduras.....	49
<b>Figura 2-9</b> Observación de levaduras al microscopio con lente de 40X .....	50
<b>Figura 2-10</b> Evaluación de crecimiento de levaduras en medio suplementado con norvalina.....	52
<b>Figura 2-11</b> Evaluación de crecimiento de levaduras en medio suplementado con 4-aza- leucina.....	54
<b>Figura 2-12</b> Evaluación de crecimiento de levaduras en medio suplementado SM para la cepa <i>S. cerevisiae</i> 209-2-8. ....	55
<b>Figura 2-13</b> Crecimiento en medio YPD de la cepa 209-2-8 expuesta a MMNG a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .....	56
<b>Figura 2-14</b> Evaluación de la producción de isobutanol en colonias resistentes a SM ...	57
<b>Figura 2-15</b> Validación de la producción de isobutanol de las colonias mutantes de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> 209-2-8 .....	58
<b>Figura 2-16</b> Comparación de la producción de isobutanol entre las cepas Q1, 209-2-8 y 209-2. ....	59
<b>Figura 2-17</b> Comparación de la producción de etanol entre las cepas Q1, 209-2-8 y 209- 2 .....	60
<b>Figura 2-18</b> Comparación de la producción de alcohol isoamílico entre las cepas Q1, 209-2-8 y 209-2.....	62

<b>Figura 2-19</b> Comparación de la producción de glicerol entre las cepas Q1, 209-2-8 y 209-2 .....	62
<b>Figura 2-20</b> Comparación de la producción de alcoholes fusel.....	63
<b>Figura 2-21</b> Validación del crecimiento de las cepas mutantes obtenidas en medio suplementado con SM .....	66
<b>Figura 2-22</b> Análisis de suplementación de L-valina y L-leucina en el medio de fermentación sobre la producción de isobutanol .....	67
<b>Figura 2-23</b> Análisis de la suplementación del medio de fermentación con L-valina y L-leucina sobre la producción de alcohol isoamílico.....	69
<b>Figura 2-24</b> Producción de isobutanol y alcohol isoamílico por cepas auxótrofas para L-leucina.....	70
<b>Figura 3-1</b> Diagrama de Pareto de efectos estandarizados obtenido en la evaluación de diseño Plackett-Burman ( $\alpha=0.05$ ).....	81
<b>Figura 3-2</b> Relación entre la producción de isobutanol y los otros productos de fermentación y el nivel de pH final.....	85
<b>Figura 3-3</b> Gráfica de contorno para la concentración de isobutanol como función del nivel del pH y de la concentración de biotina.....	88
<b>Figura 3-4</b> Gráfica de contorno para la concentración de isobutanol como función del nivel del pH y de la concentración de fosfato diácido de potasio .....	89
<b>Figura 3-5</b> Gráfica de contorno para la concentración de isobutanol como función de la concentración de fosfato diácido de potasio y de la concentración de biotina .....	89
<b>Figura 3-6</b> Relación entre la producción de isobutanol y los otros productos de fermentación y el nivel de pH final.....	91
<b>Figura 4-1</b> Esquema del sistema de fermentación utilizado para la evaluación en biorreactor .....	96
<b>Figura 4-2</b> Perfil de cambio de pH con el tiempo durante la fermentación.....	98
<b>Figura 4-3</b> Producción de biomasa de las levaduras mutantes durante la fermentación .....	98
<b>Figura 4-4</b> Perfil de consumo de azúcares durante la fermentación por la cepa Q1 .....	100
<b>Figura 4-5</b> Perfil de consumo de azúcares durante la fermentación por la cepa Q1m ..	100
<b>Figura 4-6</b> Producción de alcoholes durante la fermentación por la cepa Q1 .....	101
<b>Figura 4-7</b> Producción de alcoholes durante la fermentación por la cepa Q1m .....	102



## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1-1.</b> Propiedades físicas y químicas de etanol, isobutanol y gasolina.....	6
<b>Tabla 1-2</b> Producción de isobutanol empleando diversas estrategias y microorganismos .....	15
<b>Tabla 1-3.</b> Producción de isobutanol empleando cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> .....	18
<b>Tabla 2-1</b> Caracterización de las mieles de caña de azúcar diluidas a 16 ° Brix .....	38
<b>Tabla 2-2</b> Rendimientos obtenidos durante la fermentación con levaduras Q1 y 209-2-8 .....	65
<b>Tabla 3-1</b> Niveles de los factores evaluados en el diseño Plackett-Burman .....	78
<b>Tabla 3-2</b> Niveles empleados en el diseño factorial fraccionado Box-Benhken.....	79
<b>Tabla 3-3</b> Coeficientes del modelo obtenido para el diseño Plackett Burman .....	82
<b>Tabla 3-4</b> Resultados de la corridas evaluadas en la aplicación del diseño experimental Box-Behnken.....	87
<b>Tabla 3-5</b> Coeficientes del modelo obtenido para diseño Box Behnken .....	87
<b>Tabla 4-1</b> Rendimientos y productividades para las cepas mutantes durante la fermentación .....	105

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
$Y_{X/S}$	Rendimiento de sustrato a biomasa	g de biomasa/g de sustrato
$Y_{P/S}$	Rendimiento de sustrato a producto	g de producto/g de sustrato

### Abreviaturas

#### Abreviatura Término

<i>GE</i>	Azúcares expresados como equivalentes de glucosa
<i>SM</i>	Sulfometuron metil
<i>EMS</i>	Etil metano sulfonato
<i>MNNG</i>	N-metil, N'-nitro, nitrosoguanidina
<i>PET</i>	Polietilen tereftalato
<i>YNB</i>	<i>Yeast Nitrogen Base</i> (Medio de cultivo)
<i>GRAS</i>	<i>Generally recognized as safe</i>
<i>TBE</i>	Buffer Tris Borato EDTA
<i>PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>HPLC</i>	Cromatografía líquida de alta resolución
<i>BLAST</i>	Basic Local Alignment Search Tool
<i>NCBI</i>	National Center for Biotechnology Information
<i>ER</i>	Levadura Ethanol Red
<i>ATCC</i>	American Type Culture Collection

<i>YPD</i>	<i>Yeast Peptone Dextrose</i> – medio de cultivo
<i>YMm</i>	<i>Yeast Malt modified-</i> medio de cultivo
<i>DMSO</i>	Dimetil sulfóxido
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>EDTA</i>	ácido etilendiaminotetraacético
<i>P.A.</i>	Fosfato diácido de potasio
<i>Bio</i>	Biotina
<i>S.A.</i>	Sulfato de amonio
<i>S. Mn.</i>	Sulfato de manganeso
<i>S. Zn.</i>	Sulfato de zinc
<i>S. Mg</i>	Sulfato de magnesio
<i>S. Fe.</i>	Sulfato de hierro
<i>Pan.</i>	Pantotenato de calcio
<i>Pir.</i>	Pirimidina
<i>Tia.</i>	Tiamina
<i>MM1</i>	Medio miel 1
<i>MM2</i>	Medio miel 2
<i>MM3</i>	Medio miel 3
<i>MM4</i>	Medio miel 4
<i>MF1</i>	Medio fermentación 1
<i>MF2</i>	Medio fermentación 2





# Introducción

El elevado crecimiento de la población mundial en las últimas décadas ha conllevado a un incremento en el consumo de recursos naturales, para satisfacer las necesidades energéticas y para llevar a cabo la producción de bienes de consumo. Esto ha causado algunos efectos importantes como lo son el agotamiento de los recursos no renovables y el incremento de la contaminación ambiental. El petróleo es uno de estos recursos que ha generado un mayor impacto en la sociedad y en el medioambiente, puesto que de éste se obtienen combustibles líquidos empleados para el transporte terrestre y aéreo, como lo son la gasolina y el queroseno, combustibles que al ser utilizados generan dióxido de carbono, el cual es uno de los agentes causantes del efecto invernadero y por lo tanto del cambio climático.

Los biocombustibles pueden contribuir a la reducción en las emisiones netas de dióxido de carbono, pues en su producción se emplean materias primas que son generadas mediante procesos fotosintéticos, en las que el carbono se ha fijado previamente. Colombia tiene un alto potencial para la producción de estos productos, el cual está dado por sus condiciones geográficas favorables, que le permiten tener una alta capacidad de producción de biomasa. Esta capacidad ha sido probada a escala comercial en los procesos de producción de etanol a partir de melazas de caña de azúcar y de biodiesel desde el aceite de palma africana.

El isobutanol producido a partir de azúcares, ha sido considerado como un biocombustible alternativo, dado que respecto al etanol presenta algunas ventajas tales como mayor densidad de energía por unidad de volumen, es menos higroscópico y cuenta con una menor presión de vapor [1], [2]. La deshidratación del isobutanol en isobuteno amplía el espectro de aplicaciones que se pueden derivar de esta sustancia, por ejemplo, esta última se puede oligomerizar para producir una mezcla que puede ser empleada como combustible para aviación [3], [4]. El isobuteno también puede ser transformado en

compuestos comúnmente derivados de la industria petroquímica, como el metacrilato de metilo y el ácido tereftálico, los cuales son materias primas para la producción de polímeros [5]. Por lo tanto, la producción biológica de isobutanol representa una alternativa interesante para el desarrollo de biorrefinerías a partir de azúcares en nuestro país.

El potencial comercial que tiene el isobutanol ha generado la necesidad de desarrollar microorganismos capaces de realizar la producción eficiente de esta sustancia a partir de azúcares. Entre las especies estudiadas se encuentran las bacterias *Escherichia coli* [6], *Corynebacterium glutamicum* [7], *Bacillus subtilis* [8], *Clostridium thermocellum* [9], y las levaduras *Pichia pastoris* [10] y *S. cerevisiae* [11], entre otras. Sin embargo, es común a estas investigaciones, el empleo de un alto número de modificaciones vía ingeniería genética para alcanzar cambios importantes en la producción del isobutanol.

De estos microorganismos mencionados, el único productor natural de esta sustancia es la levadura *S. cerevisiae*, pues el isobutanol es obtenido como un subproducto de la fermentación de azúcares en la producción de etanol [12], [13], aunque es producido en pequeñas cantidades [14]. Específicamente la biosíntesis del isobutanol está altamente relacionada con el catabolismo de L-valina [15], por lo que se considera que una mayor producción de L-valina por este microorganismo promueve un incremento en la producción de isobutanol [16].

Considerando que la levadura *S. cerevisiae* tiene una alta tolerancia a diversos factores de estrés presentes en la producción industrial [14], y además, las condiciones para su empleo a escala comercial son bien conocidas, esta especie fue elegida para la realización de este estudio. También, reconociendo que la biodiversidad presente en las cepas de levadura aisladas de entornos industriales puede conferirles características que les permiten llevar a cabo los procesos con mejores rendimientos [17]. Para este estudio se analizaron cepas de levadura previamente aisladas por el grupo de investigación en entornos dedicados al aprovechamiento industrial de la caña de azúcar del municipio de Puerto López (Meta), esto con el fin de identificar la cepa que presentará la mayor producción de isobutanol y que pudiera ser empleada para una posterior etapa de mejoramiento. Asimismo, considerando que la mutagénesis aleatoria es una estrategia que ofrece la posibilidad de generación de una mayor variedad genética para la obtención de cepas con nuevas y mejores características [18], dicha estrategia fue implementada en la investigación.

En este sentido, el objetivo general de la investigación fue el obtener cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* con mayor producción de isobutanol a partir de azúcares mediante el tratamiento con agentes mutagénicos sobre una cepa nativa, caracterizando los requerimientos nutricionales de los mutantes y el comportamiento fermentativo de los mutantes obtenidos en medio sintético y en mieles de caña azúcar. Para dar cumplimiento al objetivo general, los objetivos específicos fueron:

1. Obtener y seleccionar cepas mutantes de *S. cerevisiae* con mayor producción de isobutanol a partir de azúcares realizando tratamientos con etil metano sulfonato, luz ultravioleta y nitrosoguanidina sobre una cepa nativa.
2. Establecer condiciones apropiadas de concentración de los macronutrientes y micronutrientes con mayor influencia sobre la producción de isobutanol por fermentación con la cepa mutante de *S. cerevisiae* seleccionada como la mayor productora.
3. Determinar el comportamiento cinético del consumo de azúcares, formación de biomasa y de formación de productos de fermentación de las cepas mutantes con mayor producción de isobutanol empleando medio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) y mieles de caña de azúcar.

Con el desarrollo de la investigación se lograron obtener dos cepas que fueron obtenidas mediante procesos de mutagénesis aleatoria y selección. La primera cepa obtenida fue la *S. cerevisiae* Q1, la cual tiene potencial de ser aplicada a nivel industrial, teniendo en cuenta que esta produce una mayor cantidad de aceite de fusel, con un contenido mayoritario en isobutanol, y además mantiene un alto nivel de producción de etanol durante la fermentación. Esto implica que una mayor cantidad de aceite de fusel se podría recuperar durante la rectificación del etanol, mezcla que podría ser utilizada por ejemplo para la producción de combustibles para aviación, ampliando el espectro de productos que pueden ser obtenidos a partir de las mieles de caña de azúcar.

La segunda cepa obtenida, fue la *S. cerevisiae* Q1m, la cual presenta auxotrofía para L-leucina, y fue la cepa mutante que presentó la mayor producción de isobutanol y una reducción en la producción de alcohol isoamílico, mostrando que, si se busca incrementar la cantidad de isobutanol, es importante reducir el efecto de rutas competitivas. Sin embargo, el empleo de aminoácidos en una fermentación industrial puede representar un

costo mayor, por lo que se considera que esta cepa ofrece mayores perspectivas hacia la investigación, que para su implementación en un proceso industrial.

Considerando que las cepas obtenidas en el estudio pueden servir de base para futuras investigaciones, y reconociendo que pueden ser utilizadas en procesos productivos, las cepas como producto de la investigación fueron depositadas en la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana.

Mediante la realización de estudios posteriores en los que se caractericen a nivel genómico las cepas obtenidas, será posible conocer los mecanismos que emplean estas cepas para producir mayores cantidades de isobutanol y, por lo tanto, se podrán proponer nuevas estrategias de mejoramiento, en las que intervengan otras herramientas, como por ejemplo la ingeniería genética.

Por otro lado, con la realización de este estudio también fue posible la identificación de los factores fisicoquímicos que permiten alcanzar los mayores niveles de producción de isobutanol en un medio químicamente definido. Se espera que esta información sirva para la caracterización y modificación de medios industriales a ser empleados para la producción de isobutanol por fermentación.

# 1. Marco teórico y estado del arte

## 1.1 Generalidades del Isobutanol

El isobutanol (2-metil-1-propanol) es una sustancia principalmente empleada como solvente en aplicaciones industriales, en particular, como diluyente para pinturas y resinas [19]. A partir de este alcohol es posible obtener acetato de isobutilo, sustancia que también es empleada como solvente para adhesivos, tintas y desengrasantes [20]. Industrialmente se produce mediante la hidroformilación del propileno (oxo-síntesis), con la subsecuente hidrogenación de los aldehídos formados [21]. Esta reacción consiste en la adición de una molécula de monóxido de carbono y de hidrógeno al enlace doble presente en el propileno, produciendo 1-butanal y 2- metilpropanal. La reacción ocurre a presiones entre 20 a 30 MPa y a temperaturas entre 100 y 180°C en la presencia de catalizadores a base de cobalto. Sin embargo, cuando se emplean catalizadores a base de rodio la reacción se puede conducir entre 1 a 5 MPa [19]. Dado que los procesos biológicos ocurren a temperaturas y presiones bajas, y no requieren de catalizadores basados en metales tóxicos o escasos, estos procesos pueden ser más convenientes desde el punto de vista ambiental.

Atsumi y col. [6] establecieron que el isobutanol producido biológicamente a partir de azúcares tiene el potencial de ser usado como combustible, teniendo en cuenta que, comparado con el etanol, presenta una densidad energética más cercana a la de la gasolina, una menor higroscopicidad y volatilidad. Algunas de las propiedades más importantes de estos combustibles se presentan en la Tabla 1-1.

El isobutanol ha sido evaluado como biocombustible mezclado con gasolina y en forma pura, manteniendo niveles de rendimiento en motores, mostrando que no se requieren modificaciones sobre los componentes de los mismos [22]. Además, estas mezclas con isobutanol no generan separación de fases, ni corrosión sobre el cobre, lo cual podría

implicar que no se requieran cambios en las instalaciones para el almacenamiento. Sin embargo, entre los inconvenientes que presenta el isobutanol, se encuentra que este incrementa la viscosidad cinemática, lo cual podría generar inconvenientes en el manejo de la mezcla combustible a bajas temperaturas [23].

**Tabla 1-1.** Propiedades físicas y químicas de etanol, isobutanol y gasolina.

Combustible	Etanol	Isobutanol	Gasolina
Poder calorífico inferior (MJ/L)	21.4	26.6	30-33
Temperatura de ebullición a 1 atm (°C)	78	107.9	27-225
Calor de vaporización (kJ/kg) a 25 °C	919.6	686.4	~ 351
Solubilidad del agua en combustible (% p/p) a 20°C	Miscible	20	Despreciable
Solubilidad en agua del combustible (%p/p) a 20 °C	Miscible	8.7	Despreciable
Presión de vapor del combustible a 37.8 °C (kPa)	16	3.3	54-103

Datos tomados desde Christensen y col. [1] y Tao y col. [2]

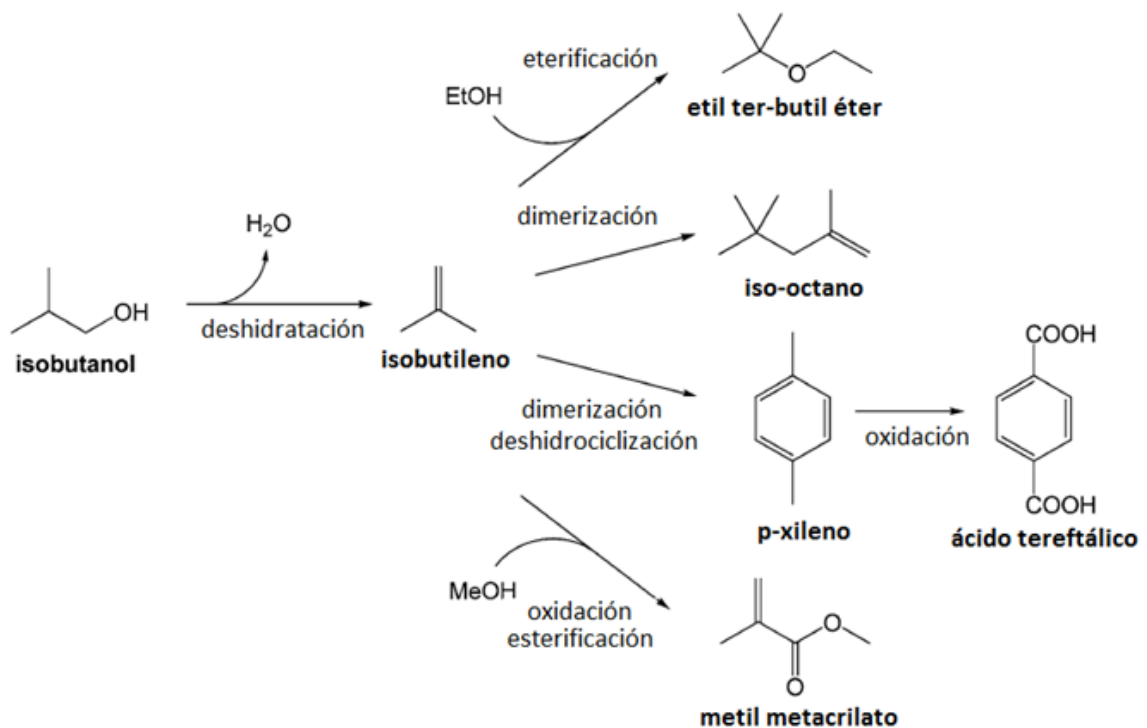
Cuando el isobutanol es producido a partir de materias primas de origen renovable y es empleado como biocombustible, brinda la posibilidad de la reducción de las emisiones totales de dióxido de carbono liberadas a la atmósfera [24]. Esto teniendo en cuenta que la combustión de hidrocarburos de origen fósil, como la gasolina o el diésel, libera altas cantidades de dióxido de carbono, que fueron captadas mediante procesos fotosintéticos que se dieron hace millones de años. Mientras en el caso de los biocombustibles, parte del dióxido de carbono liberado en la combustión, es recuperado por la biomasa vegetal que puede ser empleada para la producción de más combustibles [25]. Este aspecto es muy importante, teniendo en cuenta que el dióxido de carbono es un gas reconocido por causar efecto invernadero. Los biocombustibles en general también permiten una reducción de las emisiones de gases contaminantes tipo  $SO_x$  o  $NO_x$ , al contener menores cantidades de azufre y nitrógeno comparados con el petróleo y sus derivados [26].

Para el sector de transporte aéreo, se requieren combustibles líquidos con propiedades similares al queroseno, entre las que se incluyen una alta densidad energética, baja viscosidad, bajo punto de congelación y buena estabilidad química [3]. El isobutanol no cumple con estos requerimientos, sin embargo, la empresa GEVO Inc. ha patentado un

proceso para la transformación de isobutanol en un producto que es adecuado para ser mezclado con queroseno y que puede ser empleado como combustible para aviación [27]. Este producto ya ha sido evaluado de manera exitosa en vuelos de prueba llevados a cabo por Lufthansa y la Fuerza Aérea de los Estados Unidos [28].

El isobutanol también es considerado como una molécula plataforma (*building block*), dado que este compuesto al ser deshidratado puede ser transformado en isobutileno. Por estas razones, la producción biotecnológica de esta sustancia podría representar un paso hacia una economía sostenible [29]. Taylor y col. [5] resumen algunas de los productos que pueden ser obtenidos a partir del isobutileno.

**Figura 1-1** .Productos de la deshidratación del isobutanol



Fuente: Tomada y adaptada de Taylor y col [5].

La Figura 1-1 muestra que el mercado potencial del isobutanol no solo hace referencia a su uso como solvente o como biocombustible, sino que además muestra, su potencial para la obtención de polímeros como el PET (polietilen-tereftalato), el cual es utilizado para la fabricación de botellas plásticas [30].

## 1.2 Características generales de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* es una levadura que por siglos ha sido empleada en la producción de alimentos y de bebidas alcohólicas, se le considera a nivel biotecnológico un microorganismo muy atractivo para su uso industrial, dado que no es patogénico, por lo que es clasificado como organismo GRAS (*Generally recognized as safe*), además que ya se encuentra bien establecida la tecnología de procesos para la producción a gran escala con este microorganismo[31]. Las cepas de *S. cerevisiae* también son utilizadas para la síntesis de productos farmacéuticos proteicos, tales como la insulina, vacunas contra la hepatitis y el papilomavirus, además de derivados terpénicos [32]. En cuanto a productos químicos principalmente se produce etanol por fermentación de azúcares, aunque también se están estudiando los procesos de producción de glicerol, 1,2- propanodiol y 1,3 propanodiol, de los ácidos láctico, pirúvico y succínico, además del xilitol y ergosterol, entre otros, siendo la producción estimulada por el uso de manipulación genética [33].

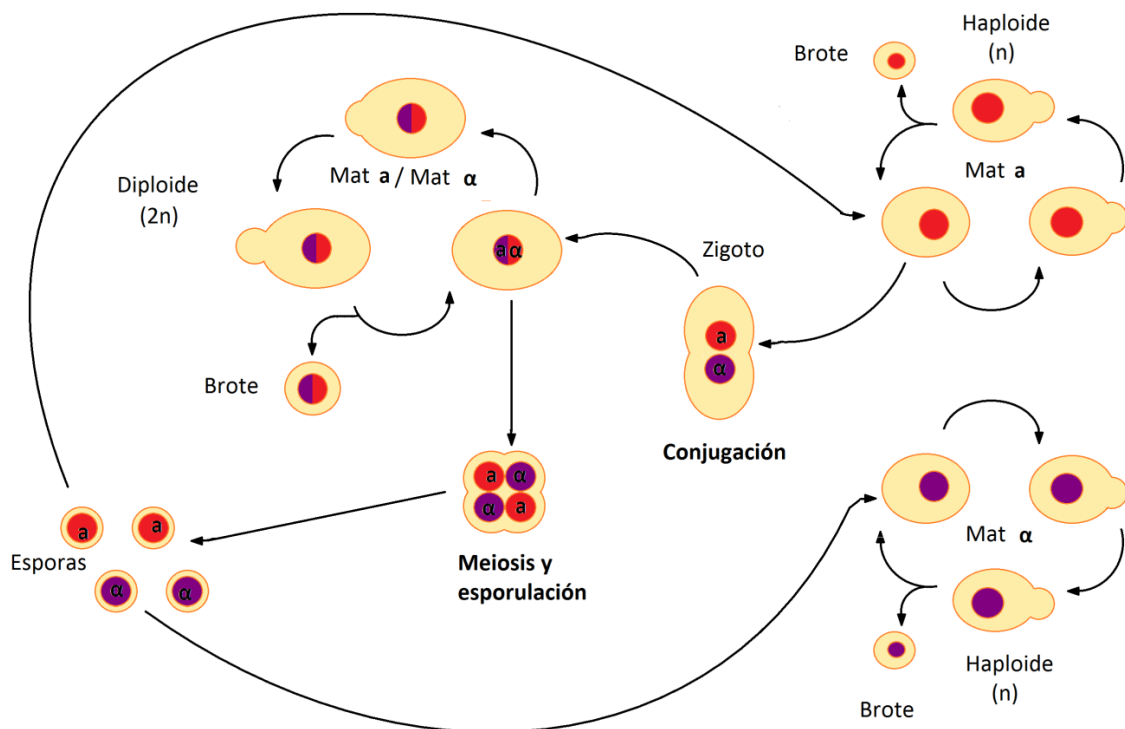
*S. cerevisiae* se reproduce de manera asexual por gemación y sexualmente mediante la formación de esporas (ascosporas), por lo que han sido clasificadas a nivel filogenético en la división Ascomycota de los hongos verdaderos (*Eumycota*). Por otro lado, cabe mencionar que *S. cerevisiae* puede estar en un estado diploide, lo cual implica que tiene 16 pares de cromosomas, o también puede estar un estado haploide conteniendo solo 16 cromosomas, además, en cualquiera de los estados de ploidía las células pueden crecer por largos periodos de tiempo [34].

### 1.2.1 Ciclo de vida de la levadura *S. cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae* presenta un ciclo de vida en el cual puede existir en fase haploide o en fase diploide. Dos levaduras en su fase haploide con tipo de Mat opuesto pueden aparearse o conjugarse para dar lugar a una levadura diploide. Una levadura diploide puede generar 4 levaduras haploides (2 pares de cada tipo de MAT) a través de meiosis, las cuales son producidas en un asca en forma de esporas [35]. Una representación del ciclo de vida de la levadura es presentada en la Figura 1-2.

Una de las particularidades de este ciclo de vida, es que algunas levaduras haploides pueden sufrir un proceso de autodiploidización, para ello la célula hija de la primera división de la levadura cambia su tipo de MAT, y al finalizar esta etapa ya se cuenta con dos células haploides de diferente tipo de MAT haciendo posible su conjugación y la formación de la célula diploide. Las levaduras que pueden sufrir este tipo de proceso se conocen como levaduras homotáticas o con ciclo de vida homotático, mientras las que no lo sufren se denominan levaduras heterotáticas o de ciclo de vida heterotático [36].

**Figura 1-2.** Ciclo de vida heterotático de la levadura *S. cerevisiae*.



Fuente: Adaptada de Steensels y col. [18].

Estos aspectos relacionados con el ciclo de vida de la levadura son de vital importancia en los procesos de mejoramiento genético debido a que puede ser conveniente la obtención de levaduras haploides, dado que las diploides o poliploides pueden tener varias copias de los genes a modificar y esto puede enmascarar algunas modificaciones [37]. Así, cuando la levadura es homotática es necesario inactivar la expresión de la nucleasa –HO,

cuya función está involucrada en el cambio de tipo de MAT, para de esta manera obtener levaduras heterotáticas con fase haploide estable [38].

### **1.2.2 Características fisiológicas de la levadura durante los procesos de fermentación**

En cuanto a los aspectos nutricionales, la *S. cerevisiae* puede crecer en presencia y ausencia de oxígeno (facultativo), además puede emplear como fuente de nitrógeno sales de amonio, urea y varios aminoácidos [39]. Bajo condiciones aeróbicas y en altos niveles de concentración de azúcares, la levadura es capaz de realizar el proceso de fermentación, como resultado puede producir etanol y acetato. Este comportamiento se denomina efecto Crabtree, y entre las razones que se dan para explicarlo se encuentra que la enzima piruvato deshidrogenasa en altos flujos glucolíticos no puede captar todo el piruvato y por lo tanto este intermediario es captado por la piruvato descarboxilasa para producir etanol [40]. Este efecto se debe considerar en procesos donde el objetivo principal es producir biomasa de levadura, dado que este proceso industrial se realiza en condiciones aeróbicas.

Por otro lado, es importante resaltar que bajo condiciones anaeróbicas, se considera que la mitocondria no existe como tal, pero si se presenta una estructura des-diferenciada denominada proto-mitocondria, estructura que retiene una fracción de las funciones de la mitocondria [41],[42]. Esto puede explicar porque la levadura es capaz de sintetizar los aminoácidos que requiere para su crecimiento bajo condiciones anaeróbicas, considerando que, en este organelo ocurren varias etapas de la biosíntesis de estas sustancias.

Cuando las levaduras realizan procesos fermentativos sobre una fuente mixta de azúcares, se puede dar lugar al proceso de represión catabólica por carbono. La glucosa o la fructosa en concentraciones en el medio de fermentación por encima de 5 g/L pueden inhibir la utilización de sacarosa, dado que intervienen a nivel de la síntesis de enzimas necesarias para su asimilación, como es el caso de la inhibición de la expresión del gen *SUC2* que codifica para una invertasa en la levadura [43]. Este aspecto se puede considerar importante en fermentaciones en las que se empleen sustratos con un alto contenido de sacarosa, como lo son los jugos, mieles y melazas de caña de azúcar.

En el proceso de fermentación alcohólica también se produce glicerol. La producción de esta sustancia durante el proceso está asociada a la osmorregulación, lo cual implica que cuando las levaduras son expuestas a medios hipertónicos producen glicerol con el fin de equilibrar la actividad acuosa externa y así prevenir la deshidratación de la célula. Para cumplir con esta regulación, el glicerol se produce a partir de la dihidroxiacetona 3-fosfato (intermediario de la glucólisis), reacción en la que interviene la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa codificada por el gen *GPD1*. El glicerol también es producido para mantener el balance redox durante la fermentación alcohólica, permitiendo la regeneración del transportador de electrones  $\text{NAD}^+$ . Este glicerol también es producido a partir de la dihidroxiacetona 3 –fosfato; sin embargo, la enzima que interviene es una glicerol 3-fosfato deshidrogenasa codificada por el gen *GPD2* [44].

### **1.3 Producción de alcoholes fusel durante la fermentación alcohólica**

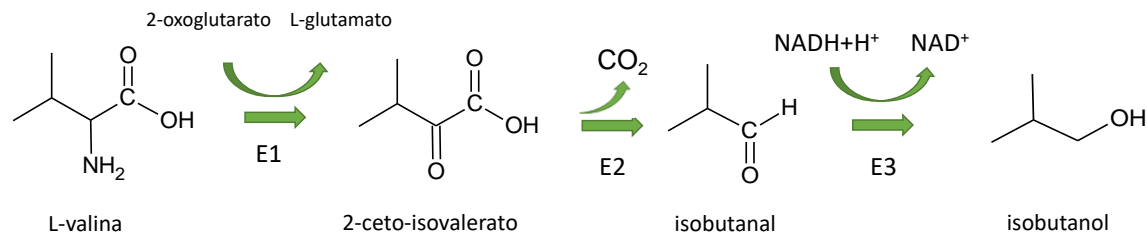
Durante la fermentación llevada a cabo en procesos industriales para la producción de etanol a partir de azúcares, se producen en menor cantidad otros alcoholes entre los que se incluyen alcohol isoamílico, isobutanol, alcohol amílico activo y propanol [45]. Estas sustancias son denominadas comúnmente como alcoholes superiores, al tener un número superior a los dos átomos de carbono en la molécula y presentar una mayor temperatura de ebullición que el etanol [46]. Industrialmente estas sustancias son recuperadas como un subproducto del proceso, durante la rectificación del etanol y hacen parte de la mezcla conocida como aceite de fusel o alcoholes fusel [47].

Patil y col. [47] indican que en plantas comerciales que emplean melazas de caña de azúcar como sustrato en la fermentación alcohólica, la producción habitual de aceite de fusel está entre 1 y 11 litros por cada 1000L de etanol producido, mientras la proporción expresada en %v/v para el isobutanol en el fusel oscila entre el 0.23% y el 5.5%, en tanto que la suma de los isómeros del alcohol amílico (alcohol isoamílico y alcohol amílico activo) se encuentra entre el 41% y el 85.2%, para el propanol se presenta entre 0.25% y 18% y el etanol oscila entre 0.057% y el 8%, sin embargo, en este aceite también pueden estar

presentes otros alcoholes y agua. La cantidad y composición del aceite de fusel es variable y dependiente de las condiciones de cultivo y la cepa empleada para la producción de etanol, de acuerdo con lo reportado por este autor. Quintero y col. [48] muestran que el aceite de fusel producido en las industrias colombianas que producen etanol, presentan un contenido expresado en % en masa de alcohol isoamílico entre 68.47% y 80.74%, de isobutanol entre 0 (por debajo del nivel de detección) y 7.28 %, con los alcoholes amílico activo y propanol en niveles no detectados en la mayoría de las muestras. Esto sugiere que el principal alcohol superior producido por las levaduras durante las fermentaciones industriales es el alcohol isoamílico, seguido por el isobutanol.

La producción de estas sustancias esta principalmente asociada al catabolismo de aminoácidos durante la fermentación, en este sentido el isobutanol es producido a partir de la L-valina. El alcohol amílico (2-metil-1-butanol) es derivado de la L-Isoleucina y el alcohol isoamílico (3-metil-1-butanol) de la L-Leucina, para lo cual emplean la denominada ruta de Ehrlich [13]. Un esquema de esta ruta es presentado a continuación para el aminoácido L-valina:

**Figura 1-3.** Catabolismo de L-valina por la ruta de Ehrlich



Fuente: Adaptada de [13], [49].

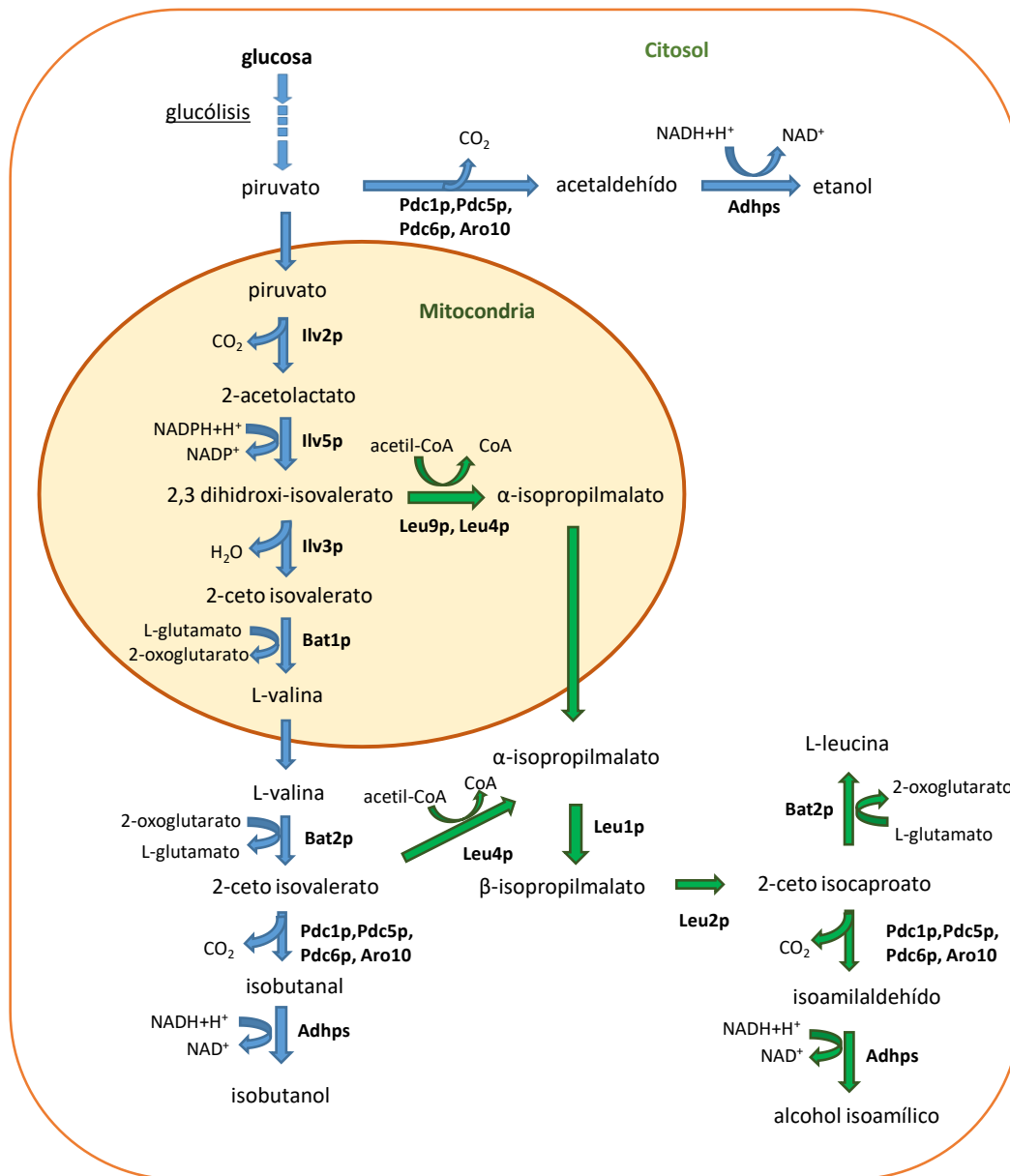
Dicha ruta inicia con una reacción de transaminación en la cual el aminoácido ramificado se convierte en un 2-ceto-ácido, mediante la transferencia del grupo amino al 2-oxoglutarato para producir L-glutamato. Este paso es catalizado por la enzima transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (representada en la Figura 1-3 como E1), codificada por los genes *BAT1* para el proceso en la mitocondria y *BAT2* para el proceso en el citosol. El intermediario 2-ceto-ácido es posteriormente descarboxilado para formar un aldehído con un átomo de carbono menos y libera una molécula de dióxido de carbono; este proceso es llevado a cabo por la enzima piruvato descarboxilasa

(representada en la Figura 1-3 como E2), para el caso del catabolismo de la L-valina y L-leucina la actividad esta mediada por los productos de los genes *PDC1*, *PDC5* y *PDC6* [15]. Finalmente, el aldehído es reducido para la producción del alcohol mediante la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (representada en la Figura 1-3 como E3). Los genes *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4* Y *ADH5* están involucrados con esta actividad. Esta enzima utiliza el cofactor NADH por lo que la ruta de Ehrlich ofrece una alternativa para la regeneración de NAD<sup>+</sup> [13]. Cabe resaltar que las últimas dos actividades enzimáticas están involucradas en la obtención de etanol a partir del intermediario piruvato.

Por otro lado, se ha probado que las levaduras son capaces de producir los alcoholes en medios sintéticos sin fuentes orgánicas de nitrógeno y en donde la capacidad de producción también está ligada a la cepa empleada [50]. Esto muestra que la levadura es capaz de sintetizar isobutanol de manera anabólica durante su proceso fermentativo.

La ruta metabólica propuesta para la producción de isobutanol a partir de glucosa es descrita por Chen y col. [14] y se presenta en la Figura 1-4. La biosíntesis del isobutanol está ligada a la de la L-valina, por lo que los múltiples pasos que permiten la biosíntesis de dicho alcohol son realizados por enzimas que permiten la biosíntesis de este aminoácido. Partiendo del piruvato producido durante la glucólisis, como primer paso en la biosíntesis de isobutanol, actúa la enzima acetolactato sintasa, la cual combina dos moléculas de piruvato para producir una molécula de 2-acetolactato y una molécula de dióxido de carbono. Esta enzima contiene dos subunidades, una catalítica y una reguladora, las que son codificadas por los genes *ILV2* y *ILV6* respectivamente. El 2-acetolactato es convertido en 2,3 dihidroxi-isovalerato por la enzima acetohidroxiácido reductoisomerasa, la cual es codificada por el gen *ILV5*. Esta acción enzimática requiere del cofactor NADPH. Estas tres reacciones iniciales ocurren en la mitocondria bajo condiciones aeróbicas. El 2,3 dihidroxi-isovalerato es transformado a 2-cetoisovalerato mediante la acción de la enzima dihidroxiácido deshidratasa, la cual esta codificada por el gen *ILV3*. Este producto final puede ser transformado en L-valina por la transaminasa para aminoácidos ramificados codificada por el gen *BAT1*, este aminoácido puede ser transportado al citosol y en este es transformado a isobutanol mediante la ruta de Ehrlich. Como otra posibilidad, el 2-cetoisovalerato podría ser transportado directamente hacia el citosol y continuar los pasos para su transformación a isobutanol.

**Figura 1-4.** Ruta para la biosíntesis de isobutanol a partir de glucosa para *S. cerevisiae*.



Fuente: Adaptada de Chen *et al* [14], Wess *et al* [51] y Park *et al* [52].

En cuanto a la regulación de la biosíntesis de valina por *S. cerevisiae*, se ha identificado que sobre la enzima acetolactato sintasa está el primer paso en la regulación en la ruta metabólica desde piruvato, debido a la disminución de la actividad enzimática mediada por la concentración de valina. Esta enzima tiene una subunidad catalítica y una unidad reguladora y a pesar de que la primera subunidad no requiera la presencia de la segunda

para tener actividad, esta estimula una mayor actividad enzimática; además se ha encontrado que el ATP con su complejo con  $Mg^{2+}$ , reducen la inhibición por valina [53].

En la Figura 1-4 también se presenta la ruta metabólica para la biosíntesis de L-leucina y de alcohol isoamílico. Esta ruta se considera competitiva a la de producción de isobutanol ya que comparten el mismo intermediario metabólico (2- ceto isovalerato), contribuye al consumo de  $NADH+H^+$  y emplea las mismas enzimas de la ruta de Ehrlich. Por lo tanto, puede ser importante evaluar estrategias que reduzcan la influencia de esta ruta sobre la producción de isobutanol.

## 1.4 Producción de isobutanol empleando microorganismos recombinantes

Reconociendo la necesidad de producir isobutanol a través de procesos biológicos, varios estudios se han realizado empleando cepas de diferentes microorganismos e implementando diferentes estrategias para incrementar su producción. En la Tabla 1-2 se encuentran listados algunos de los estudios más relevantes para la producción de isobutanol en especies microbianas distintas a *S. cerevisiae*.

**Tabla 1-2** Producción de isobutanol empleando diversas estrategias y microorganismos

Microorganismo	Modificaciones realizadas	Rendimiento (% respecto al máximo teórico)	Concentración final (g/L)	Fuente
<i>Escherichia coli</i> . Cepa JCL16	Se sobreexpresó parte de la ruta biosintética para la producción de L-valina desde piruvato hasta 2-cetoisovalerato. Realizaron la expresión heteróloga de la enzima 2-ceto ácido descarboxilasa (Kivd) de <i>Lactococcus lactis</i> , de la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh2) de <i>S. cerevisiae</i> y de la enzima acetolactato sintasa (AlsS) de <i>Bacillus subtilis</i> . Se empleó glucosa como sustrato.	86 %	22.0	Atsumi y col. [6]
<i>E. coli</i> . Cepa JCL16	Se realizó mutagénesis aleatoria y selección con norvalina, el cual es un análogo tóxico de L-valina. Esto permitió incrementar la producción de L-valina y junto con la expresión heteróloga de la enzima Kivd de <i>L. lactis</i> y de la enzima Adh2 de <i>S. cerevisiae</i> , se logró una mayor producción de isobutanol. Además, se realizó un análisis	76 %	21.2	Smith and Liao [54]

Microorganismo	Modificaciones realizadas	Rendimiento (% respecto al máximo teórico)	Concentración final (g/L)	Fuente
	genómico del mutante para corregir mutaciones negativas. Se empleó glucosa como sustrato.			
<i>Corynebacterium glutamicum</i> . Cepas CRZ1.	Se sobreexpresaron los genes que codifican para las enzimas acetolactato sintasa, acetohidroxiácido reductoisomerasa y dihidroxiácido deshidratasa, además se sobreexpresaron los genes que codifican para las enzimas Kivd de <i>L. lactis</i> y Adh2 de <i>S. cerevisiae</i> . Se evaluó también la enzima alcohol deshidrogenasa AdhP de <i>E. coli</i> , que presentó menor inhibición al isobutanol. La producción de isobutanol se realizó en un medio con agitación, pero sin aireación. Se empleó glucosa como sustrato.	36 % aprox.	25.4	Yamamoto y col. [7]
<i>Bacillus subtilis</i> Cepas BSUL05.	La cepa parental del estudio ya tenía una transformación que aseguraba la sobreexpresión del gen que codifica para la enzima acetolactato sintasa, además tenía la expresión de los genes heterólogos que codifican para las enzimas cetohidroxiácido reductoisomerasa y dihidroxiácido deshidratasa de <i>C. glutamicum</i> , la enzima Kivd de <i>L. lactis</i> y Adh2 de <i>S. cerevisiae</i> . La siguiente mejora fue obtenida mediante la disrupción de la expresión del gen que codifica para la enzima glucosa 6 –fosfato isomerasa, se sobreexpresó el gen que codifica para la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y de esta manera estimulando la ruta de las pentosas fosfato, finalmente se expresó el gen heterólogo que codifica para una enzima transhidrogenasa (UdhA) de <i>E. coli</i> . Se empleó celulosa como sustrato.	63 %	6.12	Qi y col. [8]
<i>Shimwellia blattae</i> . Cepas p424bPSO	Se utilizó un operón sintético inducible que contiene los genes que codifican para las enzimas AlsS de <i>B. subtilis</i> , KivD de <i>L. lactis</i> , cetohidroxiácido reductoisomerasa, dihidroxiácido deshidratasa de <i>E. coli</i> . En el estudio se emplearon cuatro especies distintas de bacterias, pero en la que se dio mayor producción fue en <i>S. blattae</i> .	47.7 %	6 g/L	Felpeto-Santero y col. [55]
<i>Clostridium thermocellum</i> . Cepas DSM 1313 $\Delta hpt$	Se sobreexpresaron los genes que codifican para las enzimas acetolactato sintasa, acetohidroxiácido reductoisomerasa y dihidroxiácido deshidratasa, además se expresó el gen heterólogo para la enzima Kivd de <i>L. lactis</i> . Se empleó celulosa como sustrato. La fermentación se realizó a 50 °C.	41 %	5.4	Lin y col., [9]
<i>Synechococcus elongatus</i> . Cepas PCC7942.	Se empleó la bacteria para la producción fotoautotrófica de isobutanol. Se bloqueó la biosíntesis de glucógeno en una cepa previamente modificada con los genes	-	0.550	Li y col. [56]

Microorganismo	Modificaciones realizadas	Rendimiento (% respecto al máximo teórico)	Concentración final (g/L)	Fuente
	heterólogos que codifican para las enzimas Kivd de <i>L. lactis</i> , AlsS de <i>B. subtilis</i> , acetohidroxiácido reductoisomerasa, dihidroxiácido deshidratasa y alcohol deshidrogenasa (YqhD) de <i>E. coli</i> , además presenta una sobreexpresión del operón <i>rbcLS</i> involucrado en la captación de dióxido de carbono a través del ciclo de Calvin.			
<i>Pichia pastoris</i> . Cepa KM71.	Se expresaron los genes heterólogos que codifican para las enzimas KivD de <i>L. lactis</i> , Adh7 de <i>S. cerevisiae</i> , además se sobreexpresaron los genes <i>ILV2</i> , <i>ILV6</i> , <i>ILV3</i> e <i>ILV5</i> . Se empleó glucosa como sustrato. El proceso se condujo de manera aeróbica.	5.4 %	2.22	Siripong y col. [10]

Algunos de los datos reportados en la Tabla 1-2 fueron calculados con el rendimiento máximo teórico igual a 0.41 g de isobutanol/ g de glucosa [57], valor que puede ser calculado mediante un balance de electrones disponibles. Estos resultados muestran que las bacterias transformadas permiten la producción con relativamente altos rendimientos. Además, también es importante mencionar que la máxima producción reportada para el isobutanol como producto principal de la fermentación es de 25.4 g/L [7]. Felpeto-Santero [55], realizaron pruebas de tolerancia a isobutanol en 2 cepas de *E. coli* y en una cepa de *S. blattae* y encontraron que a concentraciones mayores a 10 g/L de isobutanol estos microorganismos sufrían una alta inhibición en su crecimiento. Smith y col. [58], demostraron que *E. coli* y *C. glutamicum* después de haberse expuesto a concentraciones mayores a 20 g/L de isobutanol, reducían su viabilidad hasta un 20 %, esto reafirma un inconveniente que pueden presentar las bacterias al ser elegidas como plataformas para la producción de isobutanol. Por otro lado, las levaduras de la especie *S. cerevisiae* son empleadas en procesos de fermentación comerciales en los que el nivel de producción de etanol puede alcanzar el 12 % v/v, por lo que si se considera que los mecanismos que permiten esta marcada capacidad de tolerar el etanol también pueden contribuir a tolerar al isobutanol, harían de este microorganismo un agente idóneo para la producción de esta sustancia.

**Tabla 1-3.** Producción de isobutanol empleando cepas recombinantes de *S. cerevisiae*

Microorganismo	Modificaciones realizadas	Rendimiento (mg de isobutanol/g de glucosa)	Concentración final (g/L)	Fuente
<i>S. cerevisiae</i> . Cepa CEN.PK 2-1C (haploide)	Se sobreexpresó parte de la ruta biosintética para la producción de L-valina desde piruvato hasta 2-cetoisovalerato a través de la expresión de los genes <i>ILV2</i> , <i>ILV3</i> e <i>ILV5</i> . En medio mineral con glucosa bajo condiciones aeróbicas. Se sobreexpresó el gen <i>BAT2</i> trayendo como consecuencia la reducción de la velocidad específica de crecimiento.	3.86	0.154	Chen y col. [14]
<i>S. cerevisiae</i> . Cepa CEN.PK 2-1C (haploide)	Se expresaron las enzimas <i>ILV2</i> , <i>ILV3</i> e <i>ILV5</i> en el citosol de la levadura, para esto se removió de cada gen la secuencia señal que permite el transporte de proteínas a la mitocondria. Además, se suprimió la expresión del gen <i>ILV2</i> para evitar su expresión en la mitocondria. El proceso se llevó a cabo bajo condiciones aérobicas empleando glucosa como sustrato.	15	0.63	Brat y col., [59]
<i>S. cerevisiae</i> . Cepa JAY1 (diploide)	Se expresó la ruta de Ehrlich en la mitocondria con el fin de compartimentalizar la ruta de la biosíntesis de isobutanol desde piruvato en ese organelo. Se sobreexpresaron los genes <i>ILV2</i> , <i>ILV3</i> , <i>ILV5</i> y <i>ARO10</i> (codifica para una 2-cetoácido descarboxilasa), además se expresó el gen heterólogo que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa <i>AdhA</i> de <i>L. lactis</i> . La fermentación se llevó a cabo bajo condiciones microaeróbicas, empleando glucosa como sustrato.	6.4	0.635	Avalos y col. [60]
<i>S. cerevisiae</i> . Cepa W303-1A (haploide)	Se sobreexpresaron los genes <i>ILV2</i> , <i>ILV3</i> , <i>ILV5</i> y <i>POS5</i> (codifica para la enzima NADH quinasa mitocondrial). Esta última modificación se realizó para poder generar una mayor cantidad de NADPH disponible para la conversión del acetolactato en 2,3-dihidroxi-isovalerato. Se sobreexpresó una versión mutada del gen <i>ILV6</i> que presenta resistencia a la inhibición por retroalimentación por L-valina. Se introdujeron los genes heterólogos para la cetoácido descarboxilasa de <i>L. lactis</i> y alcohol deshidrogenasa de <i>E. coli</i> , ambos genes fueron modificados con secuencias que permiten la expresión en la mitocondria. La fermentación se llevó a cabo bajo condiciones microaeróbicas, empleando glucosa como sustrato.	7.81	0.313	Ofuonye y col. [61]

Microorganismo	Modificaciones realizadas	Rendimiento (mg de isobutanol/g de glucosa)	Concentración final (g/L)	Fuente
<i>S. cerevisiae</i> . Cepa CEN.PK 2-1C (haploide)	La cepa empleada en el estudio había sido previamente modificada para suprimir la expresión de los genes <i>ALD6</i> (codifica para la enzima aldehído deshidrogenasa) y <i>BAT1</i> , esto permitió reducir el flujo de carbono hacia butirato y hacia L- valina. En este estudio se suprimió la expresión del gen <i>LPD1</i> el cual codifica para una subunidad de la piruvato deshidrogenasa, con el fin de evitar la producción de acetil-coA a partir del piruvato. El plásmido empleado para la transformación además llevaba los genes <i>ARO10</i> y <i>ADH2</i> con una secuencia guía para que fueran transportados a la mitocondria, además los genes <i>ILV2</i> , <i>ILV3</i> y <i>ILV5</i> . El plásmido también contenía una versión mutada para el gen <i>LEU3</i> el cual codifica para un factor de transcripción de los genes que codifican para los aminoácidos ramificados, conjuntamente contenía los genes <i>MPC1</i> y <i>MPC3</i> , involucrados en el transporte de piruvato bajo condiciones de respiración. EL proceso se llevó a cabo empleando glucosa como sustrato y bajo condiciones aeróbicas.	16.5	0.331	Park y col., [62]
<i>S. cerevisiae</i> . Cepas CEN.PK2-1C	Se suprimió la expresión del gen <i>BAT1</i> , se sobreexpresaron los genes <i>ILV2</i> , <i>ILV3</i> e <i>ILV5</i> , además el gen homólogo <i>ARO10</i> y el gen heterólogo que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa <i>AdhA</i> de <i>L. lactis</i> fueron modificados para permitir su expresión en la mitocondria. Se empleó glucosa como sustrato y el proceso fue conducido de manera aeróbica.	12.45	1.245	Hammer y Avalos [11]

En la Tabla 1-3 se muestran algunos de los resultados obtenidos con la levadura *S. cerevisiae* a través de diferentes estudios. En general no se han podido alcanzar los mismos rendimientos y concentraciones finales a los reportados para bacterias como *E. coli*. A pesar de esto, la levadura presenta múltiples ventajas difíciles de superar por otro tipo de microorganismos para su empleo en procesos industriales. Se puede resaltar que, entre las ventajas del uso de la levadura, es que esta puede conducir el proceso bajo condiciones anaeróbicas tal y como se realiza a escala comercial para la producción de etanol; esto con el fin de reducir costos de operación al comparar la producción realizada

bajo condiciones aeróbicas. Sin embargo, ninguno de los estudios reportados con la levadura trabajó con esta restricción, por lo que se deben realizar investigaciones con este microorganismo que permitan aprovechar esta ventaja.

Bastian y col. [63] mostraron que la producción bajo condiciones anaeróbicas de isobutanol es posible, específicamente con la bacteria *E. coli*; sin embargo, para lograr esta posibilidad se debe mejorar la disponibilidad del cofactor NADPH bajo condiciones anaeróbicas, dado que se produce principalmente bajo condiciones aeróbicas, y es requerido por la cetoácido reductoisomerasa para la conversión de acetolactato en 2,3 dihidroxivalerato. Para ello estudiaron dos posibilidades; la primera consistió en introducir modificaciones al azar en el gen que codifica para cetoácido reductoisomerasa, con el fin de obtener una enzima mejorada con mayor afinidad a NADH; la segunda consistió en sobreexpresar la enzima piridina nucleótido transhidrogenasa, la cual cataliza la transferencia de equivalentes reductores entre NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>. Una aproximación semejante en las levaduras podría resultar en mayores rendimientos.

## **1.5 Herramientas para el mejoramiento genético de microorganismos**

### **1.5.1 Mutagénesis aleatoria y selección**

En la naturaleza, el metabolismo de los microorganismos es altamente regulado para evitar el desperdicio de energía y la acumulación de intermediarios y de enzimas necesarios para su biosíntesis [64]. Por lo tanto, aunque los microorganismos pueden producir una gran variedad de productos, solo lo hacen en cantidades suficientes para su beneficio. En este sentido el mejoramiento de las cepas busca aumentar la productividad de los procesos llevados a cabo por estos, así como los rendimientos, y también busca incrementar la concentración de los metabolitos o productos durante la fermentación, ya sean estos acumulados de manera intracelular y/o extracelular [65].

Una mutación es una alteración permanente de uno o más nucleótidos en un sitio específico de una cadena de ADN, la cepa que alberga esa mutación se denomina cepa mutante. Las mutaciones pueden estar asociadas a cambios tales como sustitución, deleción o re-arreglo de uno o más nucleótidos en el cromosoma. La mayoría de las mutaciones ocurren con baja frecuencia en los seres vivos en cualquier punto de un gen

( $10^{-5}$ - $10^{-10}$ /generación). En muchos casos las mutaciones son nocivas para el microorganismo, pero ciertas mutaciones pueden permitir al organismo adaptarse mejor al medioambiente. Los procesos de mutagénesis en este sentido tienen como objetivo incrementar la frecuencia de las mutaciones deseadas, minimizando el número de mutaciones letales [64].

El método más común de mutagénesis para obtener mutantes hiperproductores implica tratar a una población microbiana con un agente mutagénico, hasta que se alcance cierta tasa de mortalidad; la población sobreviviente es cultivada en cajas y posteriormente en frascos para determinar la formación de productos, esta última etapa es conocida como selección. Los agentes mutagénicos más usados son la N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (MNNG), el metilmetano sulfonato (MMS), etilmetano sulfonato (EMS), la hidroxilamina (HA) y la luz ultravioleta (UV) [66]. Los agentes químicos con mayor frecuencia empleados en ensayos de mutagénesis son el EMS y la MNNG, estos son reconocidos por causar transiciones GC→AT, tanto en procariontas como en eucariotas [67]. Las transiciones son intercambios entre purinas (A↔ G) o entre pirimidinas (C↔ T). La luz UV de onda corta puede causar dimerización de pirimidinas y entrecruces en el ADN, esto se refleja en transversiones (intercambios entre purinas y pirimidinas), deleciones, modificaciones en el marco de lectura y transiciones GC→AT [64].

Para la selección de los mutantes se pueden emplear varias estrategias, entre las que se resaltan la búsqueda aleatoria y la selección racionalizada. En la primera alternativa, de la población sobreviviente al tratamiento de mutagénesis y ya cultivada en cajas Petri, se seleccionan colonias al azar para ser evaluadas en su capacidad de producción del metabolito deseado; esta estrategia se emplea usualmente cuando no se conoce el metabolismo del microorganismo sometido al proceso. Por otro lado, con la estrategia de selección racionalizada se busca mejorar la eficiencia del proceso de selección, para ello se requiere un conocimiento básico del metabolismo y de la regulación metabólica, de manera que mediante la manipulación de las condiciones medioambientales o de los componentes del medio se pre-seleccione una cepa con unas características deseadas [64].

Una de las aplicaciones más comunes de la selección racionalizada, está en la selección de mutantes con bajos niveles de regulación en la biosíntesis de aminoácidos o derivados, por ejemplo, para la selección de cepas mutantes de *Streptomyces cinnamonensis* hiperproductoras de monesina (un antibiótico cuyo precursor es L-valina). En este sentido, Pospíšil y col. [68] emplearon análogos tóxicos de valina entre los que se encuentran el 2-amino-3-clorobutirato, el 2-aminobutirato y la norleucina en el medio de selección, con lo cual además de lograr una mejora en la producción del antibiótico, también evidenciaron que el microorganismo tenía desregulada la biosíntesis de valina, lo cual se reflejaba en el alto contenido del intermediario 2-cetoisovalerato.

Sobre la levadura *S. cerevisiae* también se ha realizado mutagénesis con fines de mejoramiento. Ramos y Calderón [69] generaron mutantes con MNNG, para aislar hiperproductores del aminoácido treonina, para ello emplearon hidroxinorvalina como análogo tóxico de este aminoácido, encontrando que 60 de las 128 cepas determinadas como resistentes a la hidroxinorvalina acumulaban treonina en el medio de cultivo en cantidad mayores a las de la cepa parental.

Watanabe y col. [70] aislaron mutantes de levadura con mayor capacidad de producción de isobutanol, empleando para ello 4-aza-DL-leucina como agente de selección y EMS como agente mutagénico. Mediante esta estrategia lograron estimular la producción de isobutanol 8 veces más que en la cepa parental alcanzando en el medio una concentración cercana a los 413 mg/L. Dicho estudio estaba encaminado a mejorar las características organolépticas del pan producido con estas cepas.

Mobini y col. [71] realizaron ensayos de mutagénesis sobre una cepa de *S. cerevisiae* empleando como agente mutagénico el EMS y como método de selección de mutantes un medio con elevadas concentraciones de etanol (superiores al 10% v/v), de esta manera lograron obtener un mutante con una mayor capacidad de producir etanol que la cepa parental en un 17.3% adicional.

Recientemente Katre y col. [72], emplearon esta metodología con el fin de obtener levaduras con mayor contenido y producción de aceites microbianos, para ello emplearon MNNG como agente mutagénico y realizaron una selección con cerulenina, el cual es un

inhibidor de la biosíntesis de ácidos grasos. Esta estrategia permitió obtener un mutante con 67 % de su contenido en lípidos respecto al 45 % de la cepa parental.

### **1.5.2 Otras herramientas de mejoramiento genético para *S. cerevisiae***

Además de la mutagénesis aleatoria, otras estrategias se han implementado exitosamente para el mejoramiento de microorganismos específicamente cuando no se tienen definidos los blancos que permiten adquirir las características deseadas. Entre estas se pueden nombrar la evolución adaptativa en laboratorio y el *genome shuffling*.

La evolución adaptativa en laboratorio ha sido empleada para mejorar el crecimiento de microorganismos sobre sustratos de interés y para mejorar la resistencia a condiciones de estrés. Esta metodología consiste en mantener el microorganismo cultivado bajo condiciones definidas por largos periodos de tiempo, en intervalos de semanas a años, en los que se seleccionan fenotipos con mejor adaptación a las condiciones de cultivo. Posteriormente, con el fin de determinar los cambios en genéticos que determinan las características de estos fenotipos, se puede realizar la secuenciación del genoma [73]. Además, mediante técnicas de recombinación es posible corroborar cuales de los cambios genéticos presentados determinan de manera más efectiva el fenotipo deseado [74].

En el mismo sentido, la técnica denominada en inglés *genome shuffling* (reordenamiento aleatorio del genoma) ha recibido especial atención, puesto que también permite la obtención de microorganismos con características mejoradas que pueden depender de un gran número de genes, no todos con función conocida [75]. La técnica consiste en tres etapas, en la primera se genera diversidad genética en una población, para ello se pueden inducir mutaciones empleando agentes químicos, UV o radiación. En segundo lugar, la población es sujeta a un proceso de *screening* o selección con el fin de identificar o enriquecer los mutantes con mejores rendimientos. Finalmente, los mejores organismos (genomas) son combinados por medio de hibridación asexuales (fusión de protoplastos) o sexuales (esporulación y apareamiento). Esto causa que las combinaciones de mutaciones benéficas puedan ser creadas y las mutaciones negativas puedan ser removidas. Sin embargo, esta técnica podría requerir de asistencia robótica para automatizar las

diferentes etapas y lograr identificar un mayor número de microorganismos en cada etapa con las características deseadas [76].

## 1.6 Conclusiones

- La revisión presentada en este capítulo muestra el potencial que ofrece el isobutanol como una alternativa para el desarrollo sostenible, considerando que esta sustancia se puede producir a partir de sustratos renovables a través de procesos fermentativos, los cuales son reconocidos por llevarse a cabo bajo condiciones cercanas a las ambientales de presión y temperatura. Además, el isobutanol es una sustancia muy versátil que puede ser empleada como biocombustible para vehículos de transporte terrestre, por lo tanto, puede contribuir a la reducción de las emisiones netas de gases de efecto invernadero. Esta sustancia también puede ser transformada para uso como combustible de aviación y además en un gran número de compuestos de interés comercial convirtiéndose en una materia prima clave en el establecimiento de biorrefinerías.
- La producción biológica de isobutanol enfrenta varios retos, entre los que se encuentran las bajas concentraciones de producto alcanzadas durante la fermentación. Mediante el empleo de herramientas de ingeniería genética se ha buscado mejorar la producción de isobutanol en diversas especies de microorganismos, a través de la introducción o sobreexpresión de algunos de los genes responsables de la biosíntesis de L-valina, y de la reducción del efecto de rutas competitivas. Sin embargo, a pesar de estas modificaciones los niveles de producción de isobutanol son bajos para el establecimiento de un proceso que pueda ser llevado a cabo a escala comercial, limitación que también puede estar asociada a la reducida tolerancia por parte de algunos microorganismos al isobutanol. La especie de levadura *S. cerevisiae* se destaca porque presenta una alta resistencia a diversos factores de estrés presentes en los biorreactores utilizados a escala comercial, entre los que se encuentra la elevada concentración de etanol. Por lo tanto, este microorganismo puede ser una alternativa interesante para el establecimiento de un proceso de producción de isobutanol, reconociendo que esta levadura produce naturalmente este alcohol durante la fermentación y que la implementación de estrategias de mejoramiento genético como la mutagénesis aleatoria podrían incrementar la producción de esta sustancia por parte de esta

levadura, además esta estrategia facilitaría la identificación de nuevos blancos a ser empleados en procesos de mejoramiento dirigidos.



## 2. Mutagénesis y selección de levaduras con mayor producción de isobutanol

Durante la fermentación de azúcares la levadura *Saccharomyces cerevisiae* produce otros alcoholes además del etanol, tales como el propanol, el isobutanol, el alcohol isoamílico y el alcohol amílico activo entre otros, aunque siempre en pequeñas proporciones [47]. La cantidad de cada uno de estos depende de la cepa empleada, del sustrato y de las condiciones de fermentación [13]. Específicamente el isobutanol puede ser transformado en productos de alto valor agregado, ya que puede ser empleado como materia prima para la producción de sustancias obtenidas tradicionalmente a partir del petróleo, posibilitando alternativas de desarrollo sostenible, considerando que el isobutanol sería producido a partir de fuentes renovables [5], [29]. La levadura *S. cerevisiae* presenta altas ventajas como microorganismo para la producción industrial del isobutanol, ya que tiene alta tolerancia a niveles bajos de pH y a otros factores de estrés, además, las condiciones para su empleo a nivel industrial son bien conocidas, facilitando el escalamiento del proceso y su producción en infraestructura ya existente [14].

Las levaduras presentes en entornos industriales en los que se procesan azúcares para la producción de etanol, pueden presentar adaptaciones que les permiten realizar la fermentación de manera más eficiente en términos de mayor rendimiento, productividad y tolerancia a la contaminación microbiana. Por ejemplo, en Brasil dos aislados desde destilerías son utilizados en varias plantas comerciales de producción de etanol debido a las ventajas que presentan frente a levaduras tradicionales [17], [77]. Esto muestra el potencial que tienen los aislados naturales de levaduras, ya que estos presentan fenotipos interesantes para ser empleados en procesos industriales, fenotipos que pueden ser caracterizados para la identificación de nuevos blancos para el mejoramiento de levaduras [18].

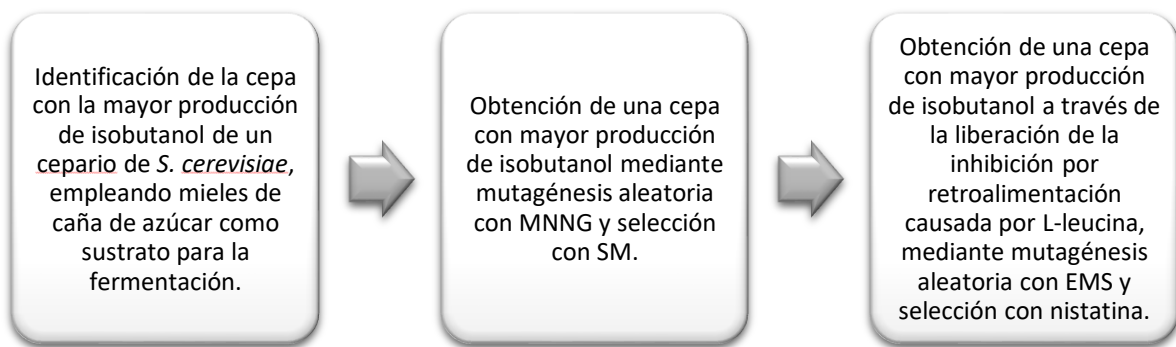
Por otro lado, la mutagénesis aleatoria es una técnica de mejoramiento genético que no tiene blancos definidos, pero con la que se pueden obtener microorganismos con mejores características. Por ejemplo, con el empleo de esta técnica se desarrolló la cepa de *Penicillium chrysogenum* empleada en la producción comercial de penicilina [78]; técnica que aún se sigue utilizando para la obtención de cepas mejoradas con mayor producción de metabolitos primarios o secundarios [54], [72], [79]. Esta técnica ha sido aplicada exitosamente en *S. cerevisiae* para obtener fenotipos que dependen de un alto número de genes, que afectan varias características tales como tolerancia al etanol [71], tolerancia a la congelación [80], tolerancia a inhibidores de fermentación [81]. Después de la inducción de variación genética mediante el uso de agentes mutagénicos, es necesaria una subsiguiente etapa de selección, la cual es facilitada por la introducción de presión selectiva [18].

El sulfometuron metil (SM) es un herbicida perteneciente a la familia de las sulfonilureas, esta sustancia inhibe la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (L-valina, L-leucina, por ejemplo) en plantas y otros organismos. Específicamente este compuesto actúa sobre la enzima acetolactato sintasa, la cual cataliza la primera reacción en la biosíntesis de estos aminoácidos. Su mecanismo de acción es a través del bloqueo del acceso del sustrato al sitio activo de la enzima [82]. Teniendo en cuenta que la biosíntesis del isobutanol está fuertemente ligada a la biosíntesis de L-valina, el SM es una sustancia que puede ser empleada para generar una presión selectiva en ensayos para mejoramiento genético encaminados a la producción de isobutanol.

Mediante la presente investigación se buscó obtener una cepa de *S. cerevisiae* con una mayor producción de isobutanol. Para ello, la investigación se llevó a cabo en dos fases, en la fase inicial se evaluaron las levaduras pertenecientes a una colección biológica de aislamientos previamente obtenidos en una planta de producción de etanol, para identificar la cepa que presentará la mayor producción de isobutanol durante la fermentación de los azúcares contenidos en mieles de caña de azúcar. En la segunda fase, la cepa con la mayor producción fue empleada como cepa parental para el mejoramiento genético por mutagénesis aleatoria. Se realizaron dos ensayos de mutagénesis de manera secuencial, en el primero se empleó MNNG como agente mutagénico y SM como agente de selección;

la cepa con mayor producción de isobutanol fue seleccionada para el siguiente ensayo de mutagénesis en donde se empleó EMS como agente mutagénico y nistatina para lograr el enriquecimiento de mutantes con auxotrofia para L-leucina. Los mutantes fueron evaluados en mieles para verificar la producción de alcoholes durante la fermentación. En la Figura 2-1 se presenta un esquema que resume como se llevó a cabo la investigación.

**Figura 2-1.** Esquema general de la investigación para la obtención del microorganismo.



Fuente: elaboración propia.

En este estudio también se presentan los resultados de algunos ensayos de caracterización dirigidos a corroborar la identidad de las levaduras obtenidas, así como otros para caracterizar las levaduras trabajadas y a mejorar la producción de isobutanol durante la fermentación.

## 2.1 Materiales y métodos

### 2.1.1 Microorganismos empleados

Para el desarrollo de la investigación se estudiaron aislados naturales previamente colectados en el municipio de Puerto López en el Departamento del Meta (Colombia), que habían sido identificados como pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Estas levaduras fueron obtenidas bajo la ejecución del proyecto “Aislamiento, caracterización y evaluación de levaduras nativas de Puerto López (Meta) para la

---

producción de etanol”, proyecto ejecutado bajo el Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados para Investigación Científica no Comercial No 114 (del año 2015), suscrito entre la Universidad Nacional de Colombia y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. La colección de microorganismos se encuentra en los laboratorios de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia y fue depositada en el Banco de Cepas y Genes del Instituto de Biotecnología de la misma Universidad. Las cepas son preservadas por criopreservación con 15 % de glicerol a -70 °C [83]. Se caracterizaron un total de 20 aislados de *S. cerevisiae* y se contrastó la producción con la cepa industrial *Ethanol Red*® Fermentis.

La cepa parental para los estudios de mutagénesis fue derivada de la cepa 209-2 (depositada con el Código IBUN-090-03640). La cepa con mayor producción de isobutanol obtenida de los ensayos de mutagénesis y la cepa auxótrofa para L-leucina que también presenta una mayor producción de isobutanol, fueron depositadas en la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (Registro Mundial WDMC No. 857), con los códigos CMPUJ H110 (cepa 209-2-8), CMPUJ H111 (Q1) y CMPUJ H112 (Q1m). Para la obtención de levaduras con mayor producción de isobutanol a partir de levaduras nativas de Colombia, se suscribió el Otro Sí N° 8 al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados N° 121 (2016), entre la Universidad Nacional de Colombia y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Estos microorganismos fueron depositados en la colección de acceso público y pueden ser solicitados a dicha colección con fines de investigación y docencia.

Otras cepas empleadas con fines de caracterización de asimilación de diferentes sustratos y validación de resistencia al SM fueron: *S. cerevisiae* ATCC 9763, *S. cerevisiae* CEN.PK2 (MAT $\alpha$ ; his3D1/his3D1; leu2-3\_112/leu2-3\_112; ura3-52/ura3-52; trp1-289/trp1-289; MAL2-8c/MAL2-8c; SUC2/SUC2), CEN.PK2-1C (MAT $\alpha$ ; his3D1; leu2-3\_112; ura3-52; trp1-289; MAL2-8c; SUC2), CEP.PK2-1D (MAT $\alpha$ ; his3D1; leu2-3\_112; ura3-52; trp1-289; MAL2-8c; SUC2). Las cepas CEN.PK fueron compartidas al grupo de investigación por el Dr. Johannes H. Hegemann de la Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

## 2.1.2 Medios empleados

**Medio Extracto de Levadura – Peptona –Dextrosa (YPD agar):** el contenido por cada litro de medio a preparar es de 10 gramos de extracto de levadura, 20 gramos de peptona, 20 gramos de glucosa y 20 gramos de agar agar [84]. Este medio fue empleado para el desarrollo de la levadura en cajas de Petri y para conservación a corto plazo en nevera a 4°C (no mayor a dos meses).

**Medio para esporulación:** el contenido por cada litro de medio a preparar es de 10 gramos de acetato de potasio, 1 gramo de extracto de levadura, 0.5 gramos de glucosa y 20 gramos de agar agar [84].

**Medio extracto de malta para levaduras (YM modificado):** el contenido por cada litro de medio a preparar es de 5 gramos de peptona, 3 gramos de extracto de levadura, 3 gramos de extracto de malta, 50 gramos de glucosa, 1 gramo de cloruro de amonio, 0.4 gramos de fosfato diácido de potasio. Este medio fue empleado para la generación de los inóculos para fermentación, también para los procedimientos de crioconservación y activación desde criovial.

**Medio YNB agar:** el medio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) es un medio químicamente definido. Fue adquirido de la marca Sigma, su composición y preparación puede ser encontrada en el Anexo B. La presentación adquirida no contenía aminoácidos ni sulfato de amonio. El medio final tiene un contenido por litro de 1.7 gramos de YNB, 20 gramos de glucosa, 5 gramos de sulfato de amonio (opcional) y es suplementado con 20 gramos de agar agar (también opcional) para su gelificación. Para los ensayos de selección con sulfometuron metil (SM) la concentración de esta sustancia fue ajustada a partir de un *stock* concentrado y preparado en dimetilsulfóxido (DMSO). Para los ensayos de obtención de levaduras auxótrofas para L-leucina en medio líquido no se empleó agar, y además se empleó un *stock* fresco y concentrado de nistatina preparado en DMSO, asimismo la L-leucina se adicionó desde un *stock* concentrado preparado en agua. El sulfometuron metil, el DMSO, la L-leucina y la nistatina, también fueron adquiridas de la marca Sigma.

**Medio de fermentación:** Para llevar a cabo las fermentaciones se emplearon mieles de caña de azúcar del municipio de Puerto López. Las mieles fueron diluidas en agua

destilada para ajustar la concentración hasta 16 °Bx. Para la evaluación de las levaduras del cepario, la miel no fue suplementada. Para la evaluación de los mutantes la miel fue suplementada con 500 mg/L de fosfato diácido de amonio. Para la evaluación de la fermentación con la levadura mutante con auxotrofia, se suplemento con 500 mg/L de L-leucina.

### 2.1.3 Procedimientos

**Activación de los microorganismos:** Para la realización de los ensayos de fermentación, las cepas fueron activadas transfiriendo el contenido del criovial previamente descongelado a un tubo para centrifuga de 15 ml con 5 ml de medio líquido (YM modificado) previamente esterilizado. El crecimiento se realizó por 24 horas bajo condiciones de agitación con un equipo Vortex con adaptador para tubos. La temperatura de incubación fue de 30 °C. Posteriormente se sembraron con rastrillo 100 microlitros del cultivo en cajas de Petri con agar YPD. Las cajas se incubaron a 30 °C por 48 horas. Una vez se desarrollaron las levaduras éstas fueron utilizadas como inóculo para cultivos líquidos o fueron preservadas en condiciones de refrigeración a 4 °C, por un tiempo máximo de 2 meses.

**Desarrollo del inóculo y ensayos de fermentación:** Para el desarrollo del inóculo de fermentación se tomó una colonia con un asa estéril desde un cultivo fresco de levaduras crecidas en agar YPD. La colonia se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio YM modificado y estéril. El cultivo se mantuvo a 30 °C por 24 horas en un agitador orbital a 150 rpm. Las células de levaduras fueron precultivadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad. Una vez culminada la incubación, las células fueron colectadas de manera aséptica por centrifugación a 8500 rpm y resuspendidas en solución salina para ser empleadas como inóculo para la fermentación.

**Fermentación:** Los experimentos de fermentación fueron llevados a cabo en frascos tapa rosca de 50 mL de capacidad empleando 50 mL de medio de fermentación estéril. A las tapas de estos frascos se les adaptó un sistema *airlock* el cual facilita la evacuación de los gases producidos durante la fermentación, pero no permite el ingreso de aire. Por lo tanto,

se genera una condición anaeróbica durante el proceso de fermentación. Para los ensayos de fermentación, se empleó una cámara de incubación con temperatura regulada a 30 °C. Al interior de la cámara se dispuso una plancha de agitación magnética multipozo, para la realización simultánea de varias fermentaciones. Con la agitación se impedía la floculación de las cepas durante el proceso. El tiempo de proceso fue de 48 horas.

Para la fermentación se empleó un inóculo concentrado de 0.5 mL preparado en solución salina con el fin de evitar la dilución de los azúcares presentes en la miel. En los ensayos de evaluación de las levaduras del cepario, la concentración inicial de las mismas en el medio estuvo alrededor de  $5.5 \cdot 10^6$  células/mL. Los ensayos se realizaron por triplicado.

En los experimentos de evaluación de los mutantes se empleó un inóculo más concentrado para la misma cantidad de volumen, permitiendo alcanzar una concentración inicial de las levaduras en el medio de aproximadamente  $5.0 \cdot 10^7$  células/mL. En estos ensayos se realizó una primera selección de los mutantes obtenidos sin réplica, para seleccionar solo aquellos que presentaron una mayor producción de isobutanol que la cepa parental. Para confirmar esta mayor producción se realizó un triplicado con las cepas.

**Esporulación:** para este procedimiento, las cepas a evaluar fueron sembradas en medio YPD por tres días, posteriormente una pequeña cantidad de células fueron transferidas al medio de esporulación y dispersadas sobre la superficie del mismo. En el medio de esporulación las levaduras fueron incubadas a 25 °C por 4 días. Finalmente las levaduras fueron observadas en el microscopio [83].

**Obtención de la cepa 209-2-8:** esta cepa fue obtenida mediante un ensayo de evaluación de la variabilidad de las levaduras, el cual fue realizado con el fin de determinar si las cepas presentaban cambios en su capacidad de producción de isobutanol durante el cultivo. En este ensayo se realizaron cultivos de algunas levaduras en medio líquido YMm (realizados por 24 horas, bajo condiciones de agitación a 150 rpm y a una temperatura de 30 °C), de estos cultivos se hicieron diluciones seriadas en solución salina (0.85 %p/v). La dilución 1:100000 ( $10^{-5}$ ) fue sembrada con rastrillo en medio YPD solidificado con agar. En dicha dilución fueron obtenidas colonias individuales, de las cuales algunas fueron evaluadas

para determinar la producción de alcoholes (etanol e isobutanol) durante la fermentación de mieles de caña de azúcar. La colonia 8 de la cepa de levadura 209-2, presentó de manera inesperada una mayor producción de isobutanol que el resto de las levaduras evaluadas en ensayos previos. Esta cepa fue caracterizada, evaluada nuevamente en ensayos independientes de fermentación, manteniendo la producción de isobutanol y se conservó para su uso como cepa parental para los estudios de mutagénesis.

**Caracterización de la levadura 209-2-8:** se realizó mediante pruebas de crecimiento en medio químicamente definido (YNB) suplementado con sulfato de amonio y con agar agar como agente gelificante. Estas pruebas emplearon como fuente de carbono etanol y glicerol, es decir fuentes de carbono no fermentables.

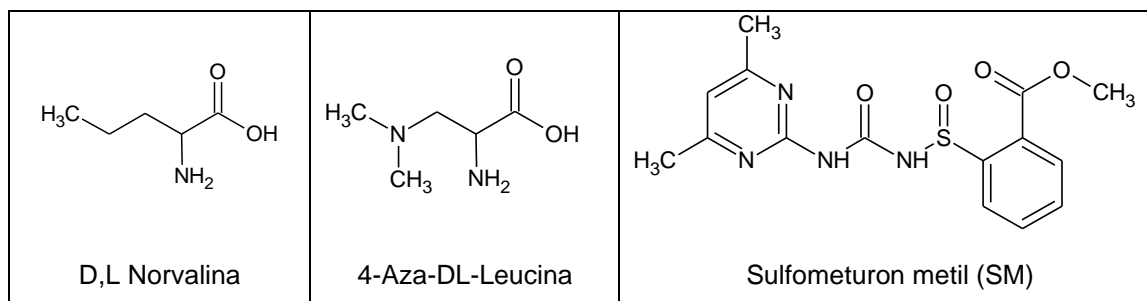
De manera adicional, se caracterizó molecularmente la levadura para corroborar su identidad como *S. cerevisiae*. Para ello se realizó una extracción de ADN genómico, se amplificó la región ITS con los *primers* genéricos ITS1 e ITS4, se secuenció y se realizó la identificación mediante el alineamiento con la herramienta *BLAST*. Los métodos y resultados detallados son mostrados en el Anexo B. Además, se realizó la prueba de presencia de los alelos MAT $\alpha$  y MAT en la levadura, mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y su detección en un gel de electroforesis. La secuencia de los *primers* utilizada para la amplificación fue la reportada por Illuxley y col. [85], para el MAT Locus 5'-AGTCACATCAAGATCGTTTATGG-3', MAT $\alpha$  5'-GCACGGAATATGGGACTACTTCG-3', MAT $\alpha$  5'-ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG-3'. Se empleó la técnica *Yeast PCR colony* que consiste en hacer crecer las levaduras durante 3 días en medio YPD con agar. Posteriormente se toma una pequeña colonia y se suspende en 25  $\mu$ L de una solución 20mM de NaOH en un tubo de PCR de 200  $\mu$ L. Las muestras se incuban en un Termociclador (Biorad T100<sup>TM</sup>) durante 15 minutos a 96 °C. Al terminal el ciclo las muestras se agitan y se centrifugan, el sobrenadante de la muestra se utiliza para la reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla para la reacción de PCR contenía los primers MAT (10  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L, MAT $\alpha$  (10  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L y MAT $\alpha$  (10  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L; el Buffer-Enzima 2X OneTaq Master Mix (New England Labs) 12.5  $\mu$ L, agua grado biología molecular 10  $\mu$ L, 1  $\mu$ L de muestra, para un total de 25  $\mu$ L de mezcla para la reacción.

El termociclador se programó así: desnaturalización inicial 1 min, luego 35 ciclos de: 94 °C por 20 segundos, 50 °C por 30 segundos y 68 °C por 2 minutos. El ciclo de terminación con una extensión final a 68 °C por 7 minutos y el reposo a 10 °C. Las muestras se analizaron en un gel de 40 mL preparado en 0.5 X de TBE con 2 % de agarosa y empleando 4 µL de EZ-VISION in gel solution (10000X). La electroforesis se realizó a 80 V por 80 min. Se sembraron 6 µL de mezcla en cada pozo (4µL de producto de PCR con 3µL de buffer de carga (azul de bromocresol). Como control en las pruebas se emplearon distintas cepas de levadura *S. cerevisiae*. Para la estimación del tamaño de los productos obtenidos se empleó un marcador de peso molecular de 50 pb.

**Mutagénesis y selección con SM:** Como cepa parental para esta fase del estudio se empleó la cepa 209-2-8. El procedimiento de mutagénesis química siguió los lineamientos generales descritos por Winston [86] y Spencer y Spencer [87]. Para ello se realizó un cultivo de la levadura 209-2-8 en medio líquido YMm por 24 horas bajo condiciones de agitación e incubación a 30 °C. Se tomaron 5 mL del cultivo, se centrifugaron a 8500 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavaron las células con agua destilada estéril. El *pellet* lavado se resuspendió en buffer fosfato pH=7.5 (100 mM). La concentración celular se ajustó a  $2 \times 10^8$  células/mL, realizando el conteo mediante una cámara Neubauer. La mutagénesis química se indujo con 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina (MNNG) en una concentración final de 50 µg/mL (se tomó de un stock concentrado del reactivo en dimetilsulfóxido). El cultivo con el mutagénico se incubó por 20 minutos a 30 °C con agitación suave. Una vez finalizada la incubación, al cultivo y al control sin adición de mutagénico, se les adicionó una solución fresca y estéril de tiosulfato de sodio al 5 %p/v con el fin de terminar la acción del mutagénico. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con agua destilada. Finalmente, la suspensión celular fue ajustada al volumen requerido con solución salina (0.85 % p/v) para mantener la concentración en  $2 \times 10^8$  células/mL. Para determinar el porcentaje de muerte causado por el mutagénico, 100 µL de la suspensión fueron sembrados en medio YPD solidificado con agar. El resto de la suspensión fue sembrada en medio selectivo YNB suplementado con sulfometuron metil (SM). La estructura química del SM es presentada en la Figura 2-2. Además se presentan la estructura de los análogos tóxicos D,L norvalina y 4-aza-D,L leucina, que también fueron

utilizados en este estudio, pero con los cuales no se presentaron resultados exitosos como se indica en la sección de resultados.

**Figura 2-2** Estructuras químicas de los agentes inhibitorios utilizados en el estudio



### **Mutagénesis para la obtención de una levadura mutante con auxotrofia para L-leucina.**

La levadura parental para esta etapa fue la levadura *S. cerevisiae* Q1, la cual fue la cepa mutante resistente a SM que presentó mayor producción de isobutanol. Para la realización de la mutagénesis se empleó el procedimiento descrito en la sección anterior, sin embargo, en lugar de trabajar con MNNG como agente mutagénico, se empleó etil metano sulfonato (EMS) en una concentración final al 5% v/v aplicado por un tiempo de 30 minutos. El cambio de agente mutagénico se sugiere en una estrategia de mejoramiento, dado que de esta forma se pueden alcanzar mayores cambios genéticos, teniendo en cuenta que cada mutagénico tiene su propio mecanismo de acción.

El procedimiento para el enriquecimiento de levaduras con auxotrofia para L-leucina que se siguió fue el descrito por Bilinski y col. [88], con algunas modificaciones. Una vez las células recibieron el tratamiento con el mutagénico y con la desactivación con el tiosulfato de sodio, las levaduras fueron lavadas y sometidas a una etapa de recuperación. Dicha etapa consistió en resuspender el cultivo celular en medio líquido YMm, incubarlo bajo condiciones de agitación por 24 horas a 30 °C. El cultivo se centrifugó y las células fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril. Después, las levaduras fueron transferidas a medio líquido YNB sin aminoácidos ni sulfato de amonio. Las levaduras fueron incubadas a 30 °C, bajo condiciones de agitación por 16 horas. El objetivo de esta etapa fue agotar

la reserva de sus aminoácidos. Posteriormente, las levaduras se colectaron y se lavaron, y se transfirieron a medio líquido YNB sin aminoácidos (pero con sulfato de amonio). Las levaduras fueron incubadas a 30 °C, bajo condiciones de agitación por 3 horas. Con esta etapa se buscó activar el crecimiento de las levaduras no auxotróficas. Finalmente, el cultivo fue tratado con una solución de nistatina (concentración final de 100 µg/mL). Este tratamiento provoca la muerte celular de las levaduras que se encuentran en crecimiento activo. Las levaduras auxotróficas obtenidas en esta etapa no mueren porque no están en crecimiento activo, dado que no se suplementa en el medio el requerimiento auxotrófico. Las células fueron posteriormente sembradas en medio YNB suplementado con 100 mg/L de L-leucina. Las colonias que se desarrollaron fueron evaluadas para verificar la auxotrofia para L-leucina. Este procedimiento consistió en ubicar las levaduras en dos medios YNB de prueba, uno con L-leucina y uno sin L-leucina. Las cepas que se desarrollaron en el medio con L-leucina, pero no en el medio sin este aminoácido se consideraron auxotrofas para esta sustancia. Este ensayo no asegura la independencia de los mutantes, debido a que la etapa de recuperación y crecimiento realizada después de la mutagénesis permite la división celular de los posibles mutantes y de esta manera es posible que los mutantes obtenidos al final del procedimiento de enriquecimiento, sean clones unos de otros. Por esta razón en esta fase solo se estudió un mutante.

#### **2.1.4 Determinación del contenido de alcoholes y azúcares**

Los alcoholes isobutanol, etanol y glicerol, fueron cuantificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello se siguió el método descrito por Avalos y col. [60] con ligeras modificaciones. En el análisis se utilizó una columna Aminex HPX-87H de Biorad. La separación se realizó con el horno a una temperatura de 65°C. La fase móvil empleada fue H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM con un flujo de 0.6 ml/min, se utilizó un detector de índice de refracción operando a una temperatura de 40 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 20µL. Los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa, contenidos en la miel fueron cuantificados empleando una columna Shodex Sugar SC1011 (Ca<sup>2+</sup>), la temperatura de elución fue de 80 °C y empleó agua desionizada como fase móvil a un flujo de 0.8mL/min. El detector de índice de refracción operó a una temperatura de 40 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 20µL. Se elaboraron curvas de calibración con soluciones de concentración

conocida preparadas con estándares de cada sustancia. Algunas de las curvas de calibración utilizadas pueden ser consultadas en el Anexo A.

## 2.2 Resultados y discusión

### 2.2.1 Perfil de producción de alcoholes de aislados naturales.

Como etapa previa a los ensayos de fermentación, las mieles empleadas como sustrato fueron caracterizadas para determinar su contenido de glucosa, sacarosa y fructosa, estos azúcares fueron analizados por HPLC. Además, se determinó el contenido de amino nitrógeno libre considerando que esta variable puede afectar el proceso de fermentación. Los resultados obtenidos para estos análisis son presentados a continuación:

**Tabla 2-1** Caracterización de las mieles de caña de azúcar diluidas a 16 ° Brix

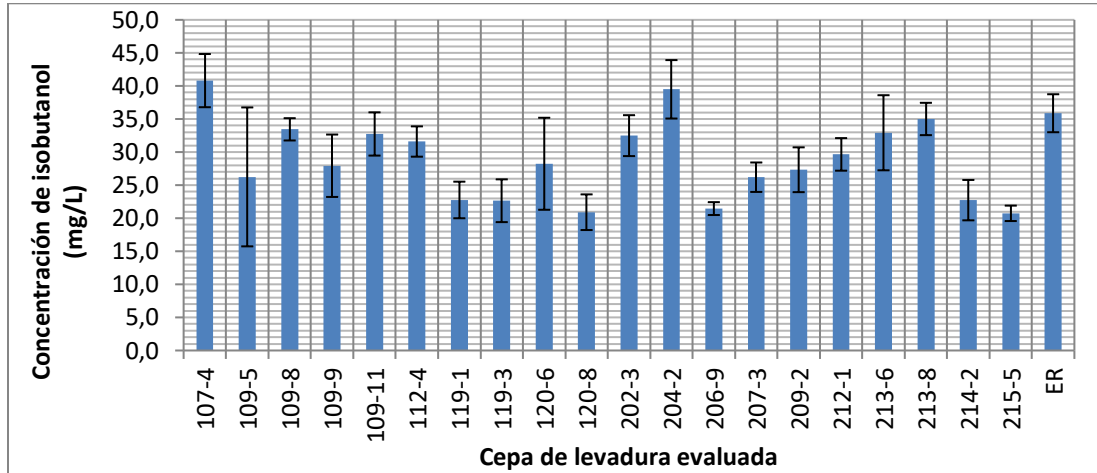
Componente	Concentración
Sacarosa	122.0 ±18.6 g/L
Glucosa	21.6 ±11.3 g/L
Fructosa	15.6 ±9.5 g/L
Azúcares expresados como equivalentes de glucosa	162.5±7.8 g/L
Amino nitrógeno libre	68.6±3.0 mg/L

Para la selección de las levaduras de acuerdo a su capacidad de producción de isobutanol, se emplearon mieles de caña de azúcar como sustrato para la fermentación, esto teniendo en cuenta que Colombia emplea este sustrato para la producción industrial de etanol por fermentación [89]. Las mieles fueron ajustadas a 16 ° Brix, para ajustar la concentración de sustrato a condiciones industriales. Las mieles presentaron cambios en el contenido de sacarosa durante el periodo de almacenamiento, esto puede deberse a reacciones de hidrólisis de este azúcar, evidenciado por un incremento gradual en la concentración de glucosa y fructosa, sin embargo, el contenido total de azúcares expresados como glucosa se mantuvo menos variable, como lo indica la Tabla 2-1.

Para el cálculo de los azúcares expresados como glucosa se tuvo en cuenta que a partir de la fructosa se pueden obtener los mismos productos de fermentación al emplear glucosa como sustrato, por lo tanto, estos dos azúcares se consideran equivalentes. Además, se tuvo en cuenta que una mol de sacarosa al hidrolizarse, produce una mol de glucosa y una mol de fructosa, lo que implica que una mol de sacarosa produce dos equivalentes de glucosa. Por esta razón, para estimar el rendimiento de los diferentes productos de fermentación en las diferentes secciones del estudio, se expresó la cantidad de sustrato como azúcares equivalentes a glucosa (GE) presentes en la miel.

El contenido de amino nitrógeno libre en jugos de caña de azúcar se ha reportado que está cercano a los 100 mg/L, contenido que se considera dependiente de la variedad de caña cultivada y de las condiciones agronómicas [90]. Este parámetro puede afectar la velocidad del proceso de fermentación [91], por lo que puede ser requerida la suplementación con una fuente de nitrógeno para incrementar la productividad [92]. Para el desarrollo de este estudio el contenido de amino nitrógeno libre fue determinado colorimétricamente mediante el método de la ninhidrina (el procedimiento empleado puede ser consultado en el Anexo B). El resultado obtenido para las mieles diluidas a 16 °Brix muestra que este valor es bajo, sin embargo, en la fase de selección de la levadura, no se consideró el ajuste de la fuente de nitrógeno, debido a que es deseable a nivel industrial el empleo de levaduras que presenten altos rendimientos en medios con el menor grado de ajuste en parámetros fisicoquímicos.

Por otro lado, en ensayos preliminares algunas de las levaduras presentaron una fuerte tendencia a flocular, particularmente las levaduras *S. cerevisiae* 204-2, 107-4 y 212-1. Dado que este comportamiento puede influir en el proceso de fermentación, se empleó un montaje de fermentación agitado magnéticamente, con el fin de asegurar una adecuada dispersión de las levaduras en el medio de fermentación. Los resultados de la caracterización de la capacidad de producción de isobutanol durante la fermentación por las levaduras nativas son presentados en la Figura 2-3.

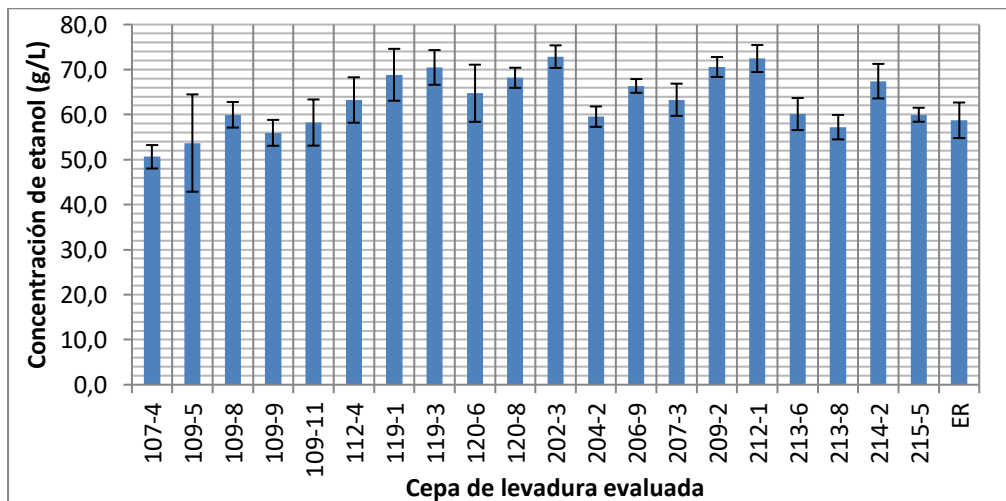
**Figura 2-3** Producción de isobutanol por las cepas de levadura nativas.

Número de réplicas: 3.

Se observa que la producción de este alcohol por las cepas nativas de *S. cerevisiae* bajo las condiciones de fermentación estudiadas, está en niveles entre 20.7 mg/L y 40.8 mg/L, siendo las levaduras que presentan la mayor producción la 107-4 y la 204-2, la dispersión entre los datos para las dos levaduras, determinada por la desviación estándar, no permite asegurar que existan diferencias significativas entre las dos. Al analizar los datos en conjunto para la producción de isobutanol por parte de las cepas nativas a través de un análisis de varianza para un único factor, en este caso el microorganismo empleado, se encuentra que el valor P es de  $2.66 \cdot 10^{-7}$  (ver Anexo B), esto implica que la producción de isobutanol por parte de las diferentes cepas es diferente desde el punto de vista estadístico.

Con el fin de caracterizar el desarrollo de la fermentación, también se determinó la concentración de etanol. La Figura 2-4 muestra los perfiles de producción de esta sustancia para las cepas evaluadas, es notorio que las cepas presentan una menor dispersión en la producción de etanol respecto a la producción de isobutanol, además, se evidencia que la cepa 107-4 presenta la menor cantidad de etanol producido.

**Figura 2-4** Producción de etanol por las cepas de levadura nativas.



Número de réplicas: 3.

El análisis de varianza de un solo factor realizado mostró que las medias de las concentraciones de etanol producido por las diferentes cepas son también estadísticamente diferentes, dado que el valor P obtenido fue de  $1.31 \cdot 10^{-7}$  ver Anexo B. Para determinar si existía una correlación entre la cantidad de isobutanol y la cantidad de etanol producida durante la fermentación, se realizó una regresión lineal (datos no mostrados), la cual presentó un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.2$ , por lo que se puede inferir que no existe relación.

Entre las observaciones más importantes de estos resultados, esta que varias de las cepas nativas presentan una mayor producción de etanol que la levadura empleada como referencia, en este caso la levadura comercial Ethanol Red®. Esto demuestra que la diversidad biológica, tiene aún mucho potencial para ser explotado inclusive para el proceso de etanol de primera generación. En Brasil estudios similares han conducido a la selección de cepas nativas que son empleadas en el proceso comercial de producción de etanol [77].

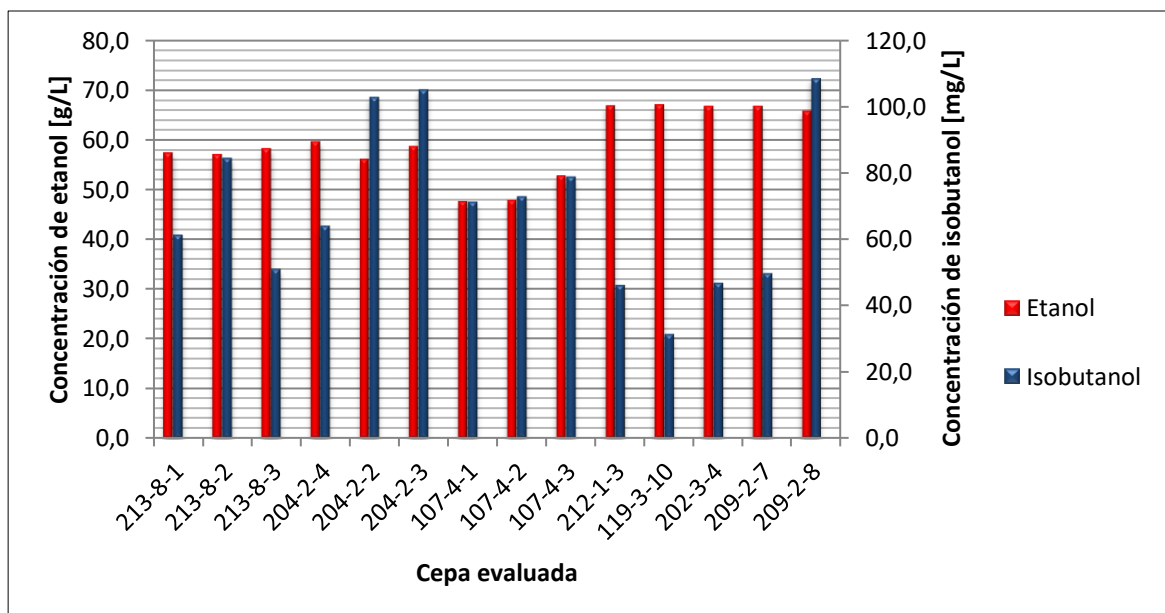
### **2.2.2 Obtención y caracterización de la levadura 209-2-8**

Con el fin de seleccionar cual levadura entre la 204-2 y la 107-4, debería ser empleada para los estudios de mutagénesis, se realizaron ensayos de capacidad de esporulación de las levaduras, esto teniendo en cuenta que se tenía como hipótesis que, si era posible obtener levaduras haploides, era posible obtener e identificar mutantes con mayor facilidad en la subsecuente etapa. Los ensayos mostraron que la levadura 107-4 presentaba una baja capacidad de esporulación, mientras la cepa 204-2, presentaba una capacidad variable, en el Anexo B se presentan imágenes de la cepa 204-2 en condición de esporulación y además el proceso realizado para la obtención de células haploides. Sin embargo, a pesar de varios intentos para la obtención de este tipo de células, no fue posible su obtención, pues al final del procedimiento las posibles células haploides aisladas fueron evaluadas en su capacidad de esporulación y siempre la presentaban, aspecto que presentan las células diploides.

Estos resultados condujeron a la necesidad de verificar si las cepas presentaban inestabilidad genética. Para ello se realizó un cultivo en medio líquido YMm por 24 horas para cada cepa a ser evaluada, y posteriormente diluciones del cultivo fueron sembradas en medio YPD. Algunas de las colonias individuales obtenidas de las diferentes cepas estudiadas fueron evaluadas en fermentación, con el fin de determinar si estas mantenían su capacidad de producir alcoholes en los mismos niveles previamente caracterizados. Cada colonia obtenida fue numerada y solo algunas de ellas fueron sometidas a fermentación. En este estudio se emplearon además las cepas 202-3, 119-3, 212-1 y 209-2, las cuales previamente habían mostrado una alta producción de etanol. Los resultados de este análisis son mostrados en la Figura 2-5.

De acuerdo con lo observado en la Figura 2-5, se evidencia que las colonias evaluadas de las cepas 107-4 y 204-2 no presentaron grandes variaciones en cuanto a su producción de isobutanol, con excepción de la colonia 4 de la cepa 204-2. Por otro lado, la colonia 8 del cultivo realizado de la cepa 209-2 presentó de manera inesperada la mayor producción de isobutanol y manteniendo su alto nivel de producción de etanol.

**Figura 2-5** Análisis de variabilidad que condujo a la obtención de la levadura *S. cerevisiae* 209-2-8



Este ensayo se condujo sin replicas para evaluar varias cepas bajo las mismas condiciones.

Estos resultados muestran que las levaduras si pueden presentar variaciones durante el cultivo. En este análisis la variación se evidenció en la producción de isobutanol, ya que fue la variable que fue medida, sin embargo, mediante el empleo de otros tipos de análisis, como, por ejemplo, la secuenciación completa de los genomas, sería posible establecer si estos cambios también pudieron darse en las otras cepas analizadas, cambios que no se reflejan necesariamente en un fenotipo con mayor producción de isobutanol.

De acuerdo con Lucena y col. [93], las levaduras al cambiar de entorno realizan adaptaciones, que pueden implicar rearrreglos cromosómicos, lo que significa que estos cambios pueden causar inestabilidad genética. En este estudio, las células evaluadas fueron colectadas desde un trapiche dedicado a la obtención de jugos y mieles de caña de azúcar, en este entorno las levaduras estaban en condiciones distintas a las que se encuentran en el laboratorio, por lo que es posible que este cambio de entorno genere cambios a nivel genético en las levaduras.

Entre las observaciones más relevantes que permiten la selección de la levadura 209-2-8 respecto a la levadura 204-2, se encuentran que además de presentar la mayor producción de isobutanol, esta tiene un nivel de producción de etanol tan alto como las levaduras previamente seleccionadas con mayor producción de etanol en estudios previos realizados por el grupo [94], específicamente como el de las cepas 202-3, 119-3 y 212-1. Esta condición permitiría una mayor producción de isobutanol, bajo las dos siguientes hipótesis posibles: la mayor producción de etanol por la levadura 209-2-8 respecto a la 204-2, puede ser posible debido a una mayor tolerancia al etanol, lo cual podría implicar que también tendría una mayor tolerancia al isobutanol, permitiendo alcanzar mayores niveles de esta sustancia en etapas posteriores de mejoramiento; por otro lado, la cepa 209-2-8 al presentar una mayor producción de etanol que la cepa 204-2, podría tener un mayor potencial para la obtención de productos de fermentación como el isobutanol, esto considerando que esta mayor producción es debida a una mayor eficiencia en la transformación de azúcares y mayor velocidad en la transformación de los mismos.

La cepa 209-2-8 fue caracterizada mediante el análisis de la secuencia de la región ITS. La región analizada para la cepa 209-2-8 corresponde a la zona que generó un alineamiento del 100% entre la secuenciación obtenida utilizando el primer ITS1 y la secuenciación utilizando el primer. Es importante aclarar que algunas de las regiones amplificadas para cada primer no tuvieron una calidad suficiente para caracterizar la secuencia completa, por lo que primero se realizó una edición para analizar un fragmento continuo que presentará la mayor calidad posible. Posteriormente se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas para cada primer con el fin de obtener una región en la que se tuviera plena fidelidad de la secuencia obtenida. Esta secuencia tuvo un tamaño de 292 pares de bases. La secuencia fue alineada con la herramienta BLAST del NCBI y la identidad de la levadura fue corroborada como *S. cerevisiae* (99% de identidad). La información detallada del análisis se encuentra disponible en el Anexo B.

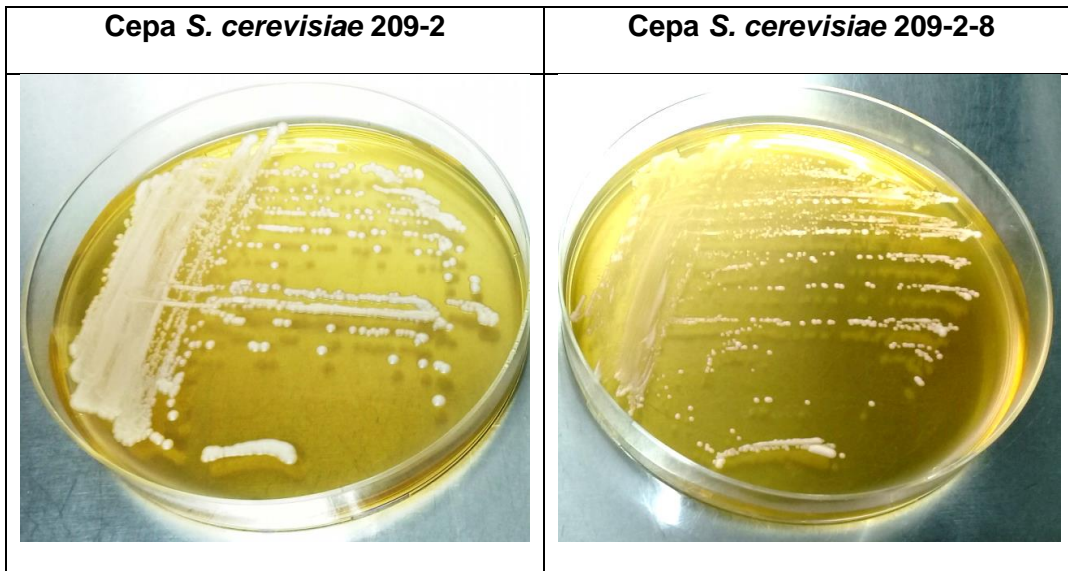
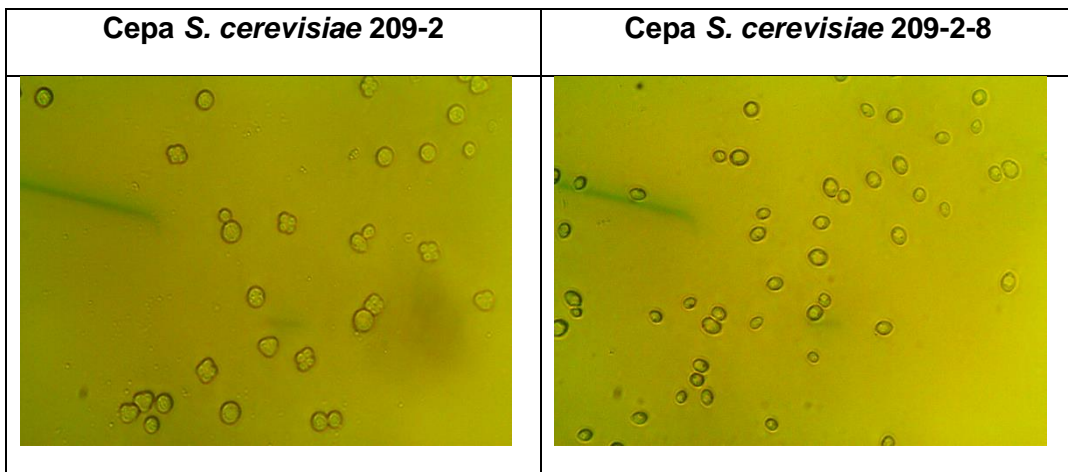
Esta levadura por lo tanto fue seleccionada para el subsiguiente estudio de mejoramiento genético por mutagénesis química. Sin embargo, considerando que la producción de isobutanol durante la fermentación de los azúcares contenidos en las mieles de caña, en un medio sin suplementación de nutrientes y con una concentración inicial de  $5 \cdot 10^6$

células/mL brindó bajas concentraciones de isobutanol, se exploró de manera preliminar la suplementación con nutrientes y la modificación de la concentración inicial de células. La aplicación de un diseño factorial para la suplementación de algunos nutrientes a la miel esta reportado en el Anexo B en forma de poster. De esta exploración se identificó que la adición de fosfato diácido de potasio estimulaba la producción de isobutanol, mientras la suplementación con sulfato de amonio la reducía (en los evaluados niveles de 212 mg N/L y 424 mgN/L). Por lo tanto, para mejorar la producción de isobutanol se suplemento el medio con fosfato diácido de amonio a 500 mg/L que aporta 68 mgN/L. Esta última sal fue empleada teniendo en cuenta que además de aportar fosfato también aporta nitrógeno, ya que las mieles empleadas como sustrato presentaban un bajo contenido de amino nitrógeno libre, como se mencionó previamente en la sección 2.2.1 y este parámetro puede afectar la velocidad a la que se da la fermentación. Este ajuste junto con la modificación de la concentración inicial de células a  $5.0 \cdot 10^7$  células/mL, permitieron que la levadura alcanzara una mayor concentración de isobutanol, pasando de 108.9 mg/L hasta 282.8 mg/L.

### **Caracterización de la cepa 209-2-8**










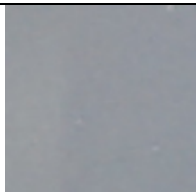
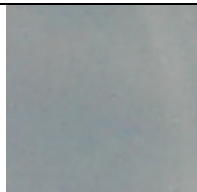

La cepa 209-2-8 desarrolla colonias de menor tamaño que la cepa 209-2 cuando esta se hace crecer en medio que emplea glucosa como fuente de carbono (YPD agar), ver la Figura 2-6. Esta característica de menor tamaño presentada en esta figura fue observada en todos los casos cuando se cultivó esta cepa.

Respecto a la capacidad de esporular, se encontró que la cepa 209-2 la presenta, la cual se evidencia por la formación de una estructura tipo asca en que la que se encuentran cuatro esporas; por otro lado, la cepa 209-2-8, no la presenta (ver la Figura 2-7). Esta evaluación se realizó por un periodo de seis días, al ser ambas cepas cultivadas bajo las mismas condiciones. Estos resultados sugieren que la cepa 209-2-8 no tiene la capacidad de esporular, por lo que no es posible obtener células haploides a partir de esta levadura.

**Figura 2-6** Colonias de las levaduras *S. cerevisiae* 209-2 y 209-2-8 en agar YPD**Figura 2-7** Levaduras a 40 X *S. cerevisiae* 209-2 y 209-2-8 en medio de esporulación.

Considerando este comportamiento, se realizó una evaluación del crecimiento en medios que tienen etanol y glicerol como fuente de carbono. Los resultados se pueden observar en la Figura 2-8.

**Figura 2-8** Caracterización del crecimiento de levaduras en fuentes de carbono no fermentables

Cepa	YNB + SA+2 % agar + 2% etanol	YNB + SA+2 % agar + 2% glicerol	YNB + SA+2 % agar + 2% glucosa
<b>S. cerevisiae</b> <b>ATCC 9763</b>			
<b>S. cerevisiae</b> <b>204-2</b>			
<b>S. cerevisiae</b> <b>209-2</b>			
<b>S. cerevisiae</b> <b>209-2-8</b>			

Al observar la Figura 2-8 se puede notar que la cepa 209-2-8 no presenta crecimiento ni en etanol ni en glicerol, mientras las otras levaduras empleadas como control si presentan un crecimiento leve. Además, se observa el desarrollo normal de las levaduras en medio YNB empleando una fuente de carbono fermentable como lo es la glucosa. El etanol y el glicerol son fuentes de carbono no fermentables, ya que para su metabolización se requiere una mitocondria totalmente funcional [95]. Este comportamiento puede deberse a mutaciones espontaneas ocurridas durante el proceso de subcultivo. Estas levaduras que

---

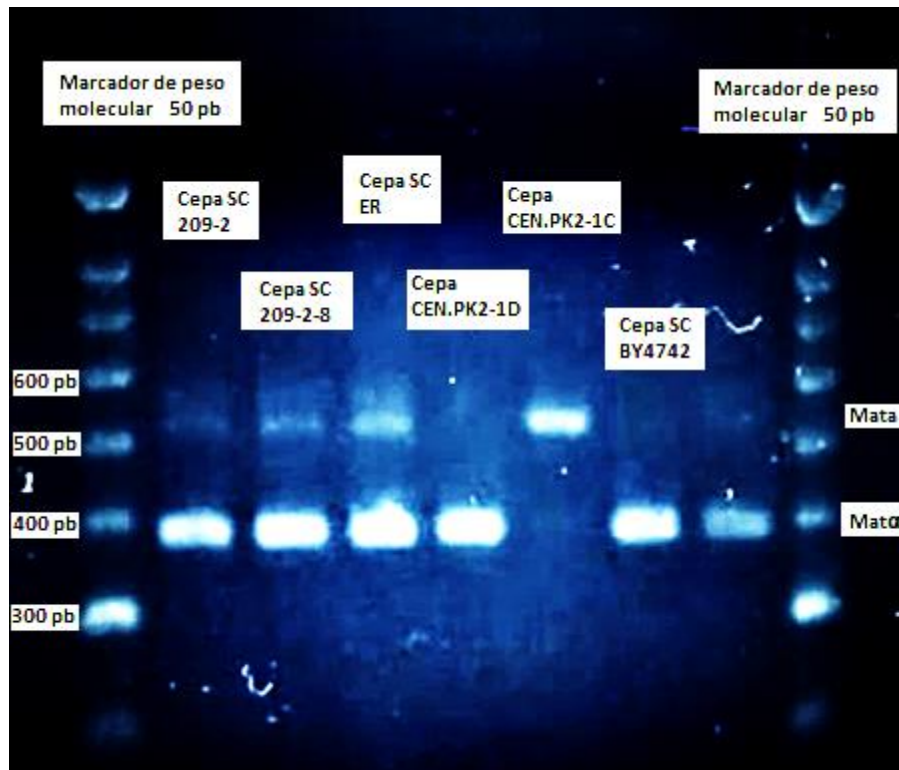
presentan estas características de pequeño tamaño de colonia y nula asimilación de fuentes de carbono no fermentables como el etanol o el glicerol comúnmente son denominadas como levaduras *petite*. Este fenotipo puede presentarse por mutaciones en el ADN mitocondrial, por la pérdida de las mitocondrias de la levadura o por algunas mutaciones en el genoma de la levadura [96]. Uno de los métodos más sencillos para la determinación de la presencia de levaduras *petite* es mediante el empleo de cloruro de tetrazolio, esta sal es incolora en su forma pura pero cuando interactúa con una mitocondria funcional se reduce formando compuestos que hacen que las colonias adquieran color rosado y rojo, mientras las colonias de las levaduras *petite* que entran en contacto con este compuesto permanecen del mismo color [97]. También podría emplearse microscopia electrónica de transición para verificar la presencia de la mitocondria en la levadura Q1 y de esta manera determinar si el fenotipo *petite* se debe a la deficiencia de este organelo o mutaciones.

Por otro lado, se buscó de manera preliminar determinar si la cepa *S. cerevisiae* 209-2-8 es una levadura haploide o diploide. Para ello se realizó la caracterización por PCR de la presencia de las regiones MAT $\alpha$  y MAT $\alpha$ . Si al realizar el análisis electroforético el producto de PCR para la cepa 209-2-8 presentaba dos bandas, significa que la levadura es al menos diploide, si la levadura presenta una sola banda esta es haploide y se puede diferenciar el tipo de MAT que posee al analizar el tamaño respecto a levaduras patrón con MAT conocido. La presencia de una banda de 544 pb indica la amplificación de la región MAT $\alpha$ , mientras la presencia de una banda de 404 pb indica la amplificación de la región MAT $\alpha$  [98].

En la Figura 2-9 presenta la imagen del gel de electroforesis obtenido en la caracterización de la presencia de regiones MAT $\alpha$  y MAT $\alpha$  en levaduras. Para este análisis se incluyeron las cepas de *S. cerevisiae* ER (Ethanol Red®), la cual ha sido descrita como diploide; la CEN.PK2-1D, la cual ha sido descrita como haploide y con MAT $\alpha$ ; la CEN.PK2-1C, la cual ha sido descrita como haploide y con MAT $\alpha$ ; y la cepa BY4742, la cual ha sido descrita como haploide y con MAT $\alpha$ . Respecto al resultado obtenido para las cepas control utilizadas, se obtuvieron bandas del tamaño y número esperados. Para el caso de las levaduras *S. cerevisiae* 209-2 y 209-2-8 se aprecia la amplificación de la región MAT $\alpha$ , y

aunque de manera tenue también se aprecia la amplificación de la región MAT $\alpha$ , estos resultados sugieren que la levadura *S. cerevisiae* no es haploide.

**Figura 2-9** Gel de electroforesis para determinación de presencia de regiones MAT $\alpha$  y MAT $\alpha$  en levaduras

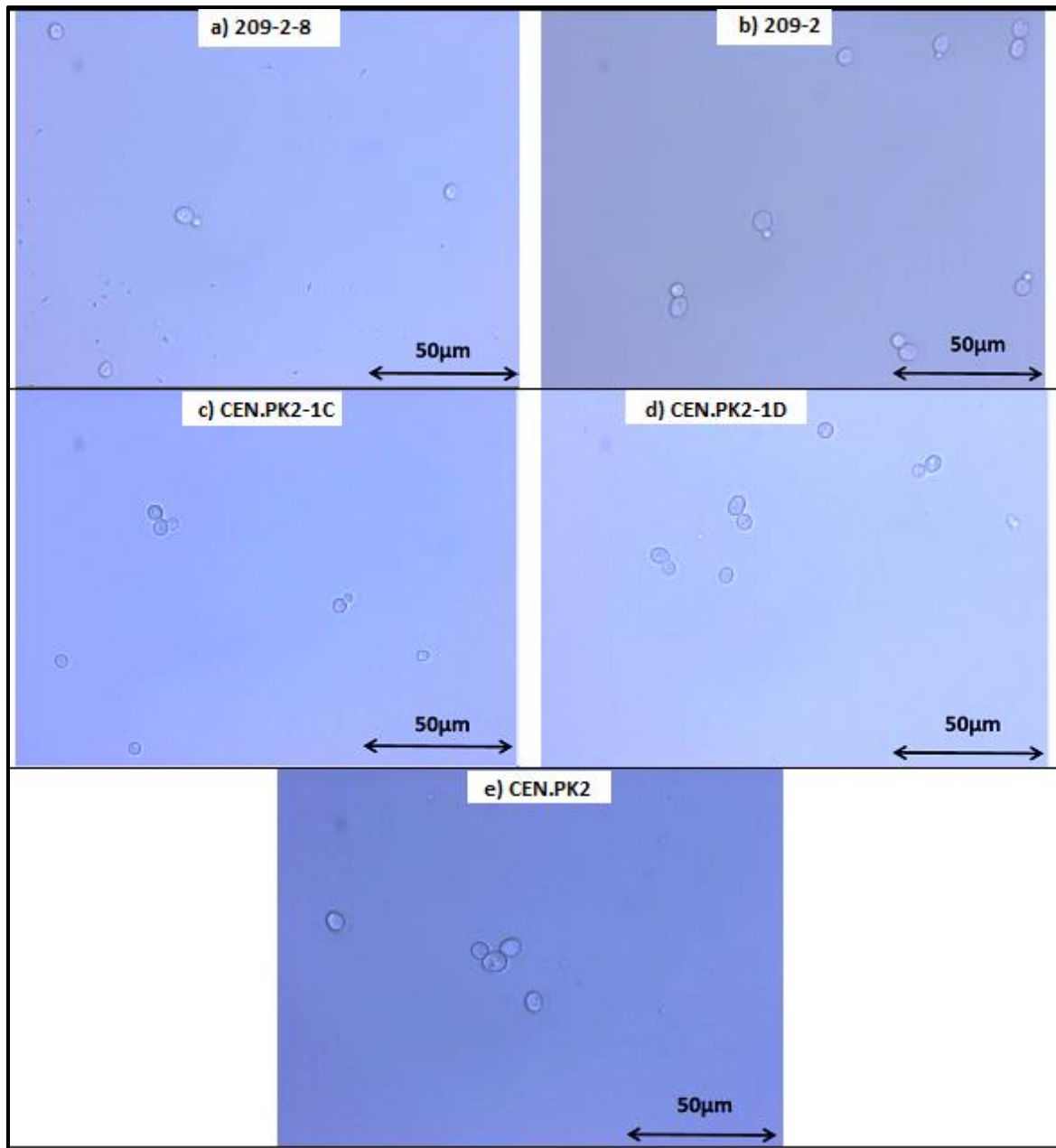


Adicionalmente, con el fin de verificar si la levadura 209-2-8 presenta una morfología típica se realizó una observación en el microscopio. Las imágenes obtenidas son mostradas en la Figura 2-10. Las levaduras utilizadas fueron crecidas en medio líquido YMm y colectadas luego de 24 horas de cultivo para su análisis.

Con el fin de asegurar un nivel de referencia común para el tamaño de las imágenes, se empleó un tamaño de 50 micrómetros, que corresponde al ancho de la cuadrícula más pequeña de una cámara de Neubauer. Las levaduras 209-2 y 209-2-8 presentan la morfología típica ovalada de las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*,

además en las imágenes también se observa que algunas células se encuentran en proceso de gemación.

**Figura 2-10** Observación de levaduras al microscopio con lente de 40X



En cuanto al tamaño se aprecia que las levaduras tienen un tamaño similar al de las cepas de referencia de *S. cerevisiae* empleadas con fines de comparación. En este caso es posible observar que las cepas haploides (CEN.PK2-1C y CEN.PK2-1D) cualitativamente presentan un menor tamaño que la cepa diploide (CEN.PK2). Estas observaciones son consistentes con lo descrito por Sherman [95]. Sin embargo, para el caso de las levaduras 209-2 y 209-2-8, las imágenes obtenidas no permiten conjeturar si las levaduras son haploides o diploides de acuerdo con su tamaño, para determinar su tamaño de manera exacta sería recomendable emplear microscopía electrónica. Finalmente, para una caracterización definitiva respecto al nivel de ploidía de las levaduras *S. cerevisiae* 209-2 y 209-2-8, sería conveniente una prueba cuantitativa de la cantidad de ADN presente en las células, como por ejemplo a través de citometría de flujo [98]. Para tomar las fotografías se utilizó la cámara Infinity 1 con el software Infinity Capture Versión 5.0.2., el microscopio utilizado fue un Olympus IBX41.

### **2.2.3 Mutagénesis y selección de mutantes con resistencia a SM**



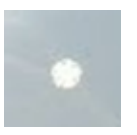

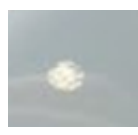

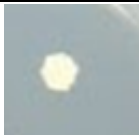
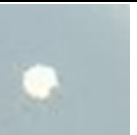
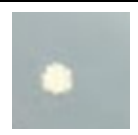
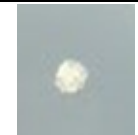

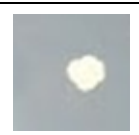
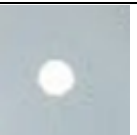
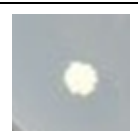
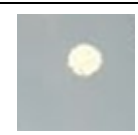





#### **Caracterización de inhibición y concentración mínima inhibitoria**

Se planteó inicialmente realizar los ensayos de mutagénesis empleando medios de selección con análogos tóxicos de L-valina y L-leucina, teniendo en cuenta que reportes previos mostraron que los mutantes resistentes a estos análogos presentaban una mayor producción de isobutanol o alcohol isoamílico, en dichos estudios se ha postulado que una de las razones por las que se da este comportamiento radica en que una incrementada capacidad de producir aminoácidos permite reducir el impacto negativo de los inhibidores presentes en el medio, y ya que la biosíntesis de estos alcoholes está vinculada con la biosíntesis de estos aminoácidos, así las condiciones que estimulan la producción de aminoácidos también estimulan la producción de los alcoholes [99]. Watanabe y col. [70] han propuesto que la actividad de la enzima acetolactato sintasa es inhibida por el aminoácido L-valina, y que es posible mediante ensayos de mutagénesis aleatoria generar levaduras con mutaciones que permitan que la enzima no presente esta inhibición, causando de esta manera una incrementada capacidad para producir el aminoácido por

parte del microorganismo. La caracterización de la inhibición por parte de la norvalina sobre las diferentes cepas nativas es presentada en la Figura 2-11.

De este ensayo se puede observar que cuando en el medio de cultivo está presente sulfato de amonio además de la norvalina, las levaduras se desarrollan relativamente bien, esto con excepción de la levadura empleada como control (*S. cerevisiae* ATCC 9763). Por otro lado, se observa que las levaduras 107-4 y 204-2 no presentan inhibición en su crecimiento en la presencia de norvalina. Estos resultados muestran que para lograr un alto nivel de inhibición en la levadura 209-2-8, la norvalina debe estar presente en niveles tan altos como 20 g/L del agente inhibitorio (2%) y en un medio que no incluya sulfato de amonio.

**Figura 2-11** Evaluación de crecimiento de levaduras en medio suplementado con norvalina

Cepa	YNB + SA+2 % agar	YNB + 2 % agar + 0.5% norvalina	YNB + SA+2 % agar + 0.5 % norvalina	YNB + 2 % agar + 2% norvalina	YNB +SA+2 % agar + 2% norvalina
<i>S. cerevisiae</i> 209-2-8					
<i>S. cerevisiae</i> 204-2					
<i>S. cerevisiae</i> 107-4					
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763					



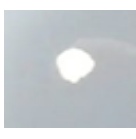

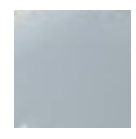

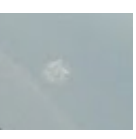
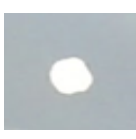


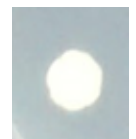



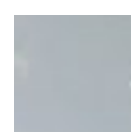
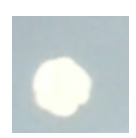
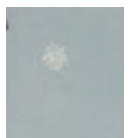
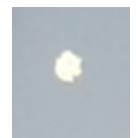


En el estudio realizado por Smith y Liao [54], en el que se buscó mejorar la producción de isobutanol en una cepa de *E. coli*, se empleó una estrategia de mejoramiento por evolución combinando varias etapas de mutación y selección, se utilizó la selección con norvalina, en este estudio la concentración mínima inhibitoria para esta sustancia en el medio fue de 2.0 g/L, aunque a medida que la cepa fue mejorada la resistencia superó una concentración de 12.5 g/L. En el caso de *S. cerevisiae* la levadura al contar con la ruta de Ehrlich es capaz de metabolizar la norvalina para convertirla en n-butanol [100], es posible que a través de este mecanismo la levadura tome el nitrógeno necesario y evite la toxicidad asociada a esta sustancia. Estos resultados además son consistentes con lo reportado por Watanabe y col. [70], pues ellos evaluaron las cepas en diferentes análogos incluyendo la norvalina, mostrando que esta sustancia no inhibió el crecimiento de las cepas de levadura evaluadas (de panadería, vónicas y de producción de sake).

La caracterización de la inhibición por parte de la 4-aza-leucina sobre las diferentes cepas nativas es presentada en la Figura 2-12. En el medio con 4-aza-leucina como agente inhibitorio se encuentra que a bajas concentraciones del agente (0.1%) y en la presencia de sulfato de amonio, las levaduras presentan crecimiento. Al incrementar la concentración del agente se observa que las levaduras presentan una total inhibición. Por esta razón este agente podría ser empleado como agente inhibitorio. Sin embargo, con este agente no fue posible seleccionar mutantes resistentes, esto al realizar procesos de mutagénesis con todos los agentes mutagénicos propuestos para el estudio.

Considerando otras alternativas que permitieran la selección de mutantes con menor regulación en la producción de L-valina y por lo tanto de isobutanol, se estudió el sulfometuron metil como agente de selección. El SM hace parte del grupo de pesticidas conocido como sulfonilureas, actúa sobre la enzima acetolactato sintasa impidiendo la síntesis de aminoácidos ramificados, por lo tanto presenta baja toxicidad en mamíferos [101]. La resistencia a esta sustancia ha sido utilizada como marcador dominante para el monitoreo de la población de levaduras durante la fermentaciones para la producción de vino [102]. Además, considerando que la levadura 209-2-8 posiblemente es una levadura

no haploide, solo las mutaciones que confieren un carácter dominante pueden alterar directamente el fenotipo [18].

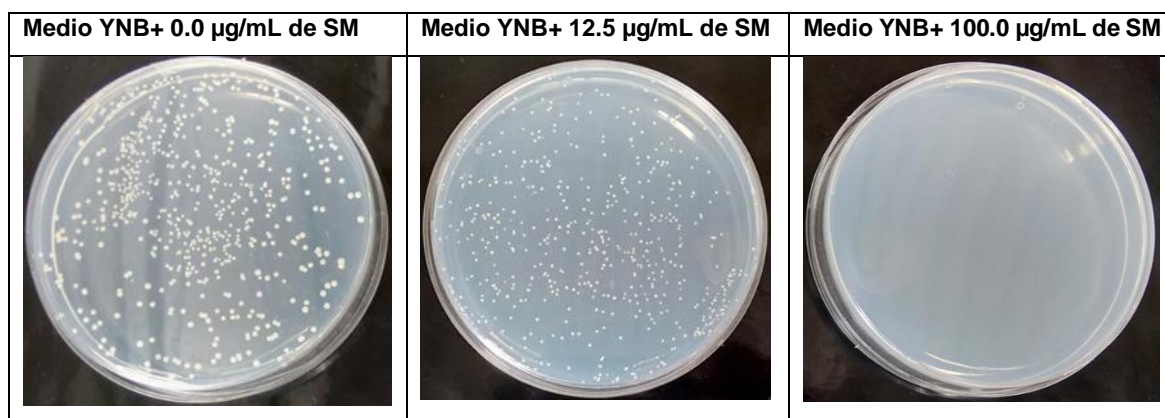
**Figura 2-12** Evaluación de crecimiento de levaduras en medio suplementado con 4-azaleucina

Cepa	YNB + SA+2 % agar	YNB + 2 % agar + 0.1% 4-azaleucina	YNB + SA+2 % agar+0.1 % 4-azaleucina	YNB + 2 % agar + 0.5% 4-azaleucina	YNB +SA+2 % agar + 0.5% 4-azaleucina
<i>S. cerevisiae</i> 209-2-8					
<i>S. cerevisiae</i> 204-2					
<i>S. cerevisiae</i> 107-4					
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763					

El ensayo preliminar de caracterización de la concentración mínima inhibitoria para el sulfometuron metil (SM) sobre la levadura 209-2-8 se presenta en la Figura 2-13. Estos resultados sugieren que la concentración mínima inhibitoria para el SM para la levadura 209-2-8 se encuentra entre 12.5 µg/mL y 100.0 µg/mL. Este ensayo también se realizó con

las levaduras 204-2 y 107-4, mostrando una tendencia similar a los resultados obtenidos con la levadura 209-2-8. Este ensayo se repitió incluyendo la concentración de SM en 50.0 µg/mL, encontrándose que a esta concentración también se inhibía totalmente el crecimiento. Sin embargo, con el fin de asegurar una mayor restricción en el crecimiento se definió la concentración de trabajo para los medios de selección en 100.0 µg/mL. Estas concentraciones obtenidas son consistentes con los reportes existentes para la inhibición de SM en *S. cerevisiae*. En el reporte realizado por Falco y Dumas [103], la concentración de SM empleada para obtener mutantes espontáneos de *S. cerevisiae* resistentes a este inhibidor, estuvo en el rango entre 3 µg/mL y 10 µg/mL. En el estudio realizado por Xie y Jiménez [101], la concentración empleada para la obtención de mutantes espontáneos, resistentes a este inhibidor fue de 20 µg/mL.

**Figura 2-13** Evaluación de crecimiento de levaduras en medio suplementado SM para la cepa *S. cerevisiae* 209-2-8.



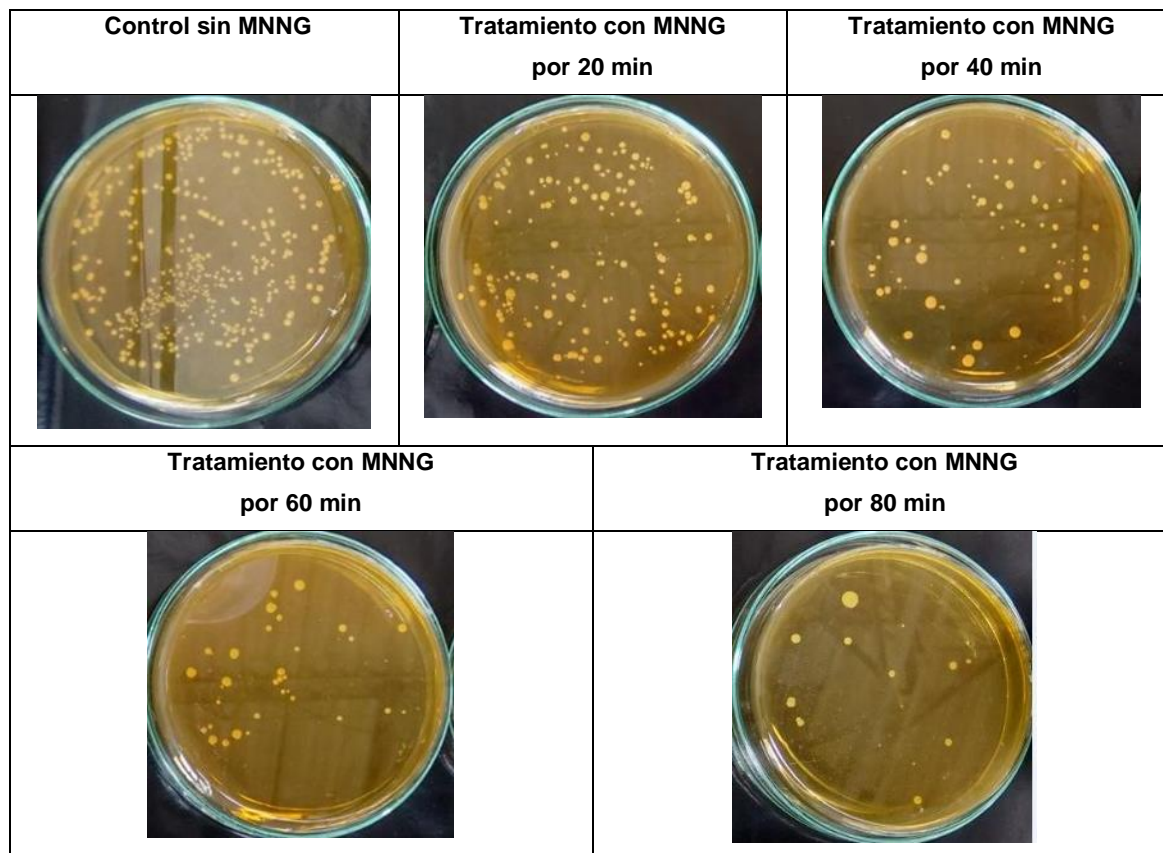
#### **Determinación de tasa de muerte para la cepa 209-2-8 en presencia de MNNG**

En la Figura 2-14 se presenta como la población de células viables decrece con la intensidad del tratamiento aplicado, el cual fue siendo más intenso al permitir un mayor tiempo de actuación del agente mutagénico sobre la población celular.

Se aprecia que el tratamiento con 50 µg/mL MNNG por 60 minutos permitió alcanzar una tasa de muerte de 92.5% de la población, valor que fue el más cercano a la tasa de muerte

del 95%, razón por la cual este tratamiento se eligió para realizar la mutagénesis con este agente.

**Figura 2-14** Crecimiento en medio YPD de la cepa 209-2-8 expuesta a MNNG a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$

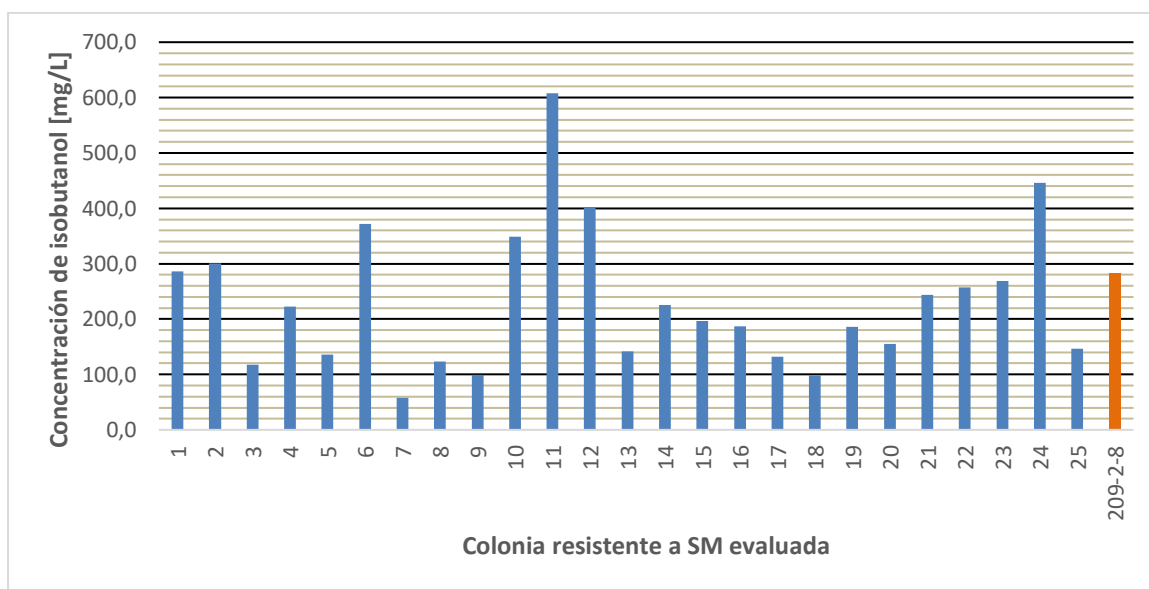


### **Obtención de las cepas mutantes de la levadura 209-2-8 con resistencia a SM**

De dos ensayos de mutagénesis y selección con sulfometuron metil fueron obtenidas un total de 25 colonias. Todas estas colonias fueron evaluadas para determinar su capacidad de producir isobutanol durante la fermentación de mieles de caña de azúcar. Este ensayo se realizó sin replicas para las colonias resistentes, pero si para la cepa parental, esto con el fin de analizar varias colonias sobre las mismas condiciones. Considerando la producción máxima de isobutanol para la cepa parental (*S. cerevisiae* 209-2-8) del estudio

como 310.1 mg/L (promedio 282.8 mg/L más una dispersión de 27.3 mg/L), se obtuvieron 5 colonias con mayor cantidad de isobutanol que la cepa parental de las 25 colonias evaluadas, es decir las colonias 6, 10, 11, 12 y 24, como se puede observar en la Figura 2-15. La colonia evaluada que presentó la mayor producción de isobutanol en el ensayo fue la 11 con 607.7 mg/L de isobutanol (1.96 veces más alta que la cepa parental).

**Figura 2-15** Evaluación de la producción de isobutanol en colonias resistentes a SM



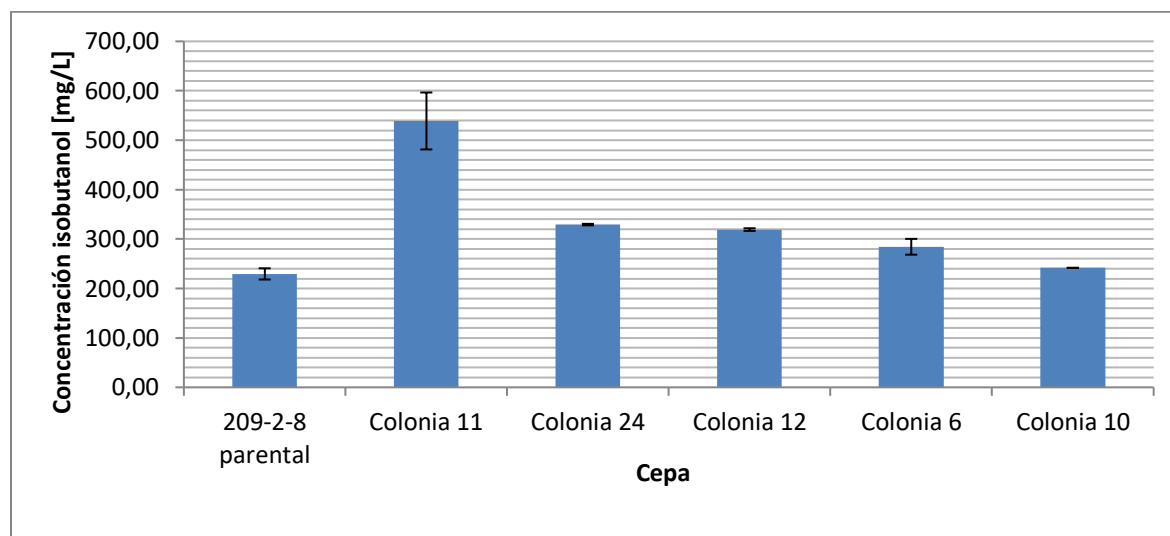
Este ensayo se condujo sin replicas para evaluar varias cepas bajo las mismas condiciones.

Con las 5 colonias evaluadas que presentaron una mayor producción de isobutanol que la cepa parental, se realizó un ensayo realizado por triplicado para validar la producción. Los resultados son presentados en la Figura 2-16.

Al analizar los resultados obtenidos se encuentra que la colonia 11 es la que produce la mayor cantidad de isobutanol durante la fermentación, aunque también presenta la mayor dispersión. En este ensayo se evidencia que los niveles de producción de isobutanol fueron un poco más bajos a los presentados en el ensayo de evaluación de las colonias resistentes, estas diferencias pueden ser debidas a variaciones en la preparación del medio de cultivo, en particular al tener en cuenta que la adición de miel al medio fue ajustada a 16 °Bx, y este parámetro que relaciona el índice de refracción tiene una alta

influencia de la temperatura, variable que a su vez cambiaba durante el día en el laboratorio. A pesar de esto, las colonias de estas levaduras obtenidas mantuvieron una mayor producción de isobutanol que la cepa parental, estas colonias se consideraron como cepas mutantes y la colonia 11 fue designada como la cepa *S. cerevisiae* Q1, la colonia 24 fue designada como la cepa *S. cerevisiae* Q2, la colonia 12 fue designada como la cepa *S. cerevisiae* Q3, la colonia 6 fue designada como la cepa *S. cerevisiae* Q4, la colonia 24 fue designada como la cepa *S. cerevisiae* Q5.

**Figura 2-16** Validación de la producción de isobutanol de las colonias mutantes de *S. cerevisiae* 209-2-8



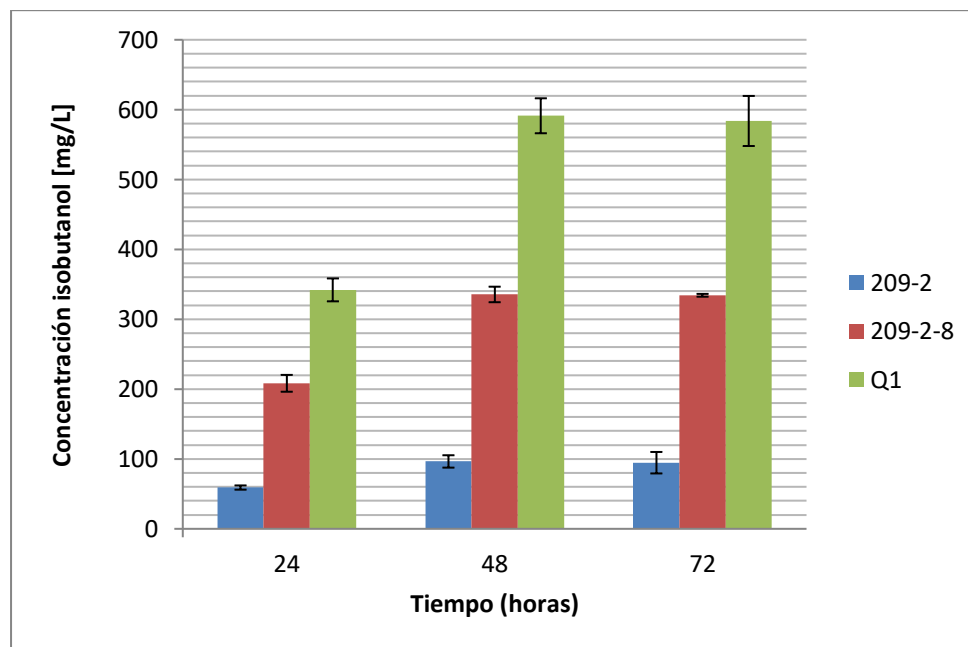
Número de réplicas: 3.

En la Figura 2-17 se observa una comparación de la producción de isobutanol entre las cepas Q1, 209-2-8 y 209-2. En la Figura 2-18, se muestra la comparación, pero para la producción de etanol. Para este análisis se tomaron muestras cada 24 horas.

Este ensayo permite verificar que para llevar a cabo el proceso de producción de isobutanol, un tiempo de fermentación es 48 horas es adecuado, esto considerando que no se evidencian grandes diferencias entre la producción a 48 horas y 72 horas. Para el caso de la producción de etanol, la Figura 2-17 muestra que existe una mayor producción de etanol al permitir la fermentación por 72 horas (74.6 g/L respecto a 70.4 g/L a 48 h), sin

embargo, en términos de productividad del proceso este tiempo no es conveniente. Además, es interesante notar que la cepa 209-2-8 es la que produce una mayor cantidad de etanol para todos los tiempos analizados, seguida por la cepa Q1. Este último resultado es consistente con la hipótesis de que la levadura *S. cerevisiae* 209-2-8 es *petite*, pues de acuerdo a lo reportado con Toksoy y col. [104], las levaduras que presentan esta condición pueden presentar mayor producción de etanol que sus respectivas cepas parentales.

**Figura 2-17** Comparación de la producción de isobutanol entre las cepas Q1, 209-2-8 y 209-2.

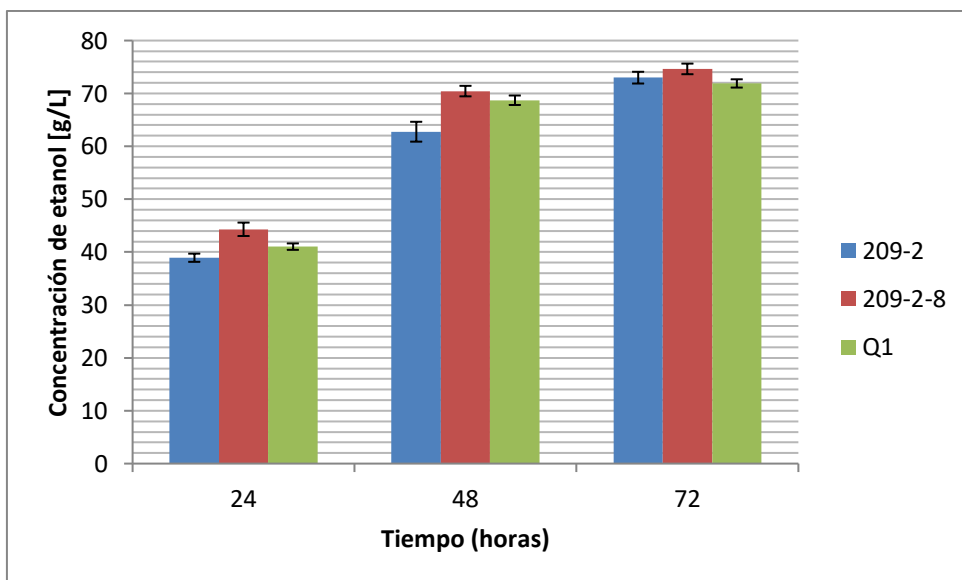


Número de réplicas: 3.

Hutter y Oliver [105] indican que esta capacidad de las levaduras *petite* de producir una mayor cantidad de etanol, ocurre principalmente en mutantes con un alterado funcionamiento en la cadena de electrones (mutaciones nucleares), mientras aquellas *petite* en las que se ha perdido la mitocondria o en la que se presentan mutaciones en el genoma mitocondrial, presentan sensibilidad al etanol, por lo que esta última condición no se espera que se haya dado, teniendo en cuenta los resultados obtenidos.

En contraste, es posible que la reducción en la producción de etanol de la cepa Q1 respecto a la 209-2-8 se deba un re-direccionamiento del carbono en sentido de la producción de isobutanol y otros subproductos como el alcohol isoamílico y el glicerol. En este caso la hipótesis planteada sobre el uso del SM como agente que permitiría la selección de levaduras con mayor producción de isobutanol, se cumplió para algunos de los mutantes obtenidos. El SM actúa inhibiendo la actividad de la enzima acetolactato sintasa, la cual permite la obtención de acetolactato desde piruvato, por lo tanto, un mutante que presente resistencia a este agente, la puede tener a través de dos posibles mecanismos: un aumento de la cantidad de enzima intracelular producida por el microorganismo, es decir mutaciones que causan la desregulación en la biosíntesis de la enzima; o por mutaciones que causen un incremento en la actividad enzimática, es decir mutaciones que cambie la estructura del sitio activo, que le permitan tener mayor actividad o mayor tolerancia a los inhibidores. Esta condición le permitiría a los mutantes una mayor biosíntesis de L-valina y por lo tanto una mayor producción de isobutanol [15].

**Figura 2-18** Comparación de la producción de etanol entre las cepas Q1, 209-2-8 y 209-2



Número de réplicas: 3.

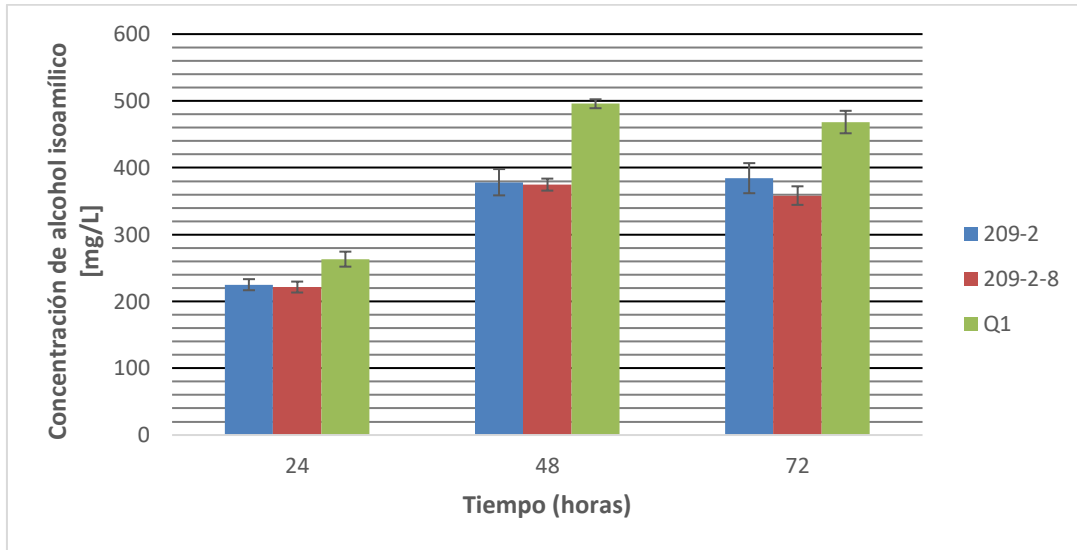
La obtención de mutantes con resistencia a sulfometuron metil que presentan mayor producción de isobutanol, no se ha descrito en la literatura hasta el momento, en este sentido este trabajo constituye el primer reporte dirigido hacia este fin. Esto teniendo en cuenta que la resistencia a SM se ha aprovechado principalmente para su uso como un marcador de resistencia para cepas industriales (dominante) [101]. Por otro lado, Watanabe y col. [70] reportan que mediante el empleo de mutagénesis al azar empleando como agente mutagénico EMS y un medio selectivo con 4-aza-leucina, trabajando con cepas comerciales, en este caso algunos de los mutantes obtenidos presentaron mayor producción tanto de isobutanol como de alcohol isoamílico. Sin embargo, como se mencionó anteriormente esta estrategia fue evaluada, pero no se obtuvieron mutantes con resistencia a esta sustancia.

Takpho y col. [16], recientemente reportaron la obtención de variantes de la proteína Ilv6 (región reguladora de la acetolactato sintasa) para *S. cerevisiae* que permiten obtener una mayor producción de L-valina. Para ello versiones mutadas del gen *ILV6* fueron evaluadas en la cepa de levadura *S. cerevisiae* BY4741 (haploide). Los plásmidos que permitieron obtener colonias resistentes a norvalina, fueron posteriormente analizados. En este caso, se encontró que la proteína Ilv6 obtenida presentaba una menor resistencia a la retroalimentación por L-valina, permitiendo una mayor producción de L-valina intracelular. Es posible que un mecanismo similar sea el que las levaduras mutantes obtenidas empleen para superar la inhibición al sulfometuron metil. Sin embargo, para probar esto se requiere realizar una clonación de los genes involucrados (*ILV2* y *ILV6*) y una secuenciación completa de las cepas, para identificar si las mutaciones que causan este fenotipo se encuentran presentes específicamente en esta región.

En la Figura 2-19 se muestra como la producción de alcohol isoamílico ha cambiado con las modificaciones presentes en las cepas. De acuerdo con lo observado en la figura, se evidencia que la producción de alcohol isoamílico por parte de las cepas 209 y 209-2-8, no es diferente, sin embargo, se encuentra que al estimular la ruta para la producción de isobutanol, también se estimula la producción de alcohol isoamílico. Estos resultados son consistentes con lo esperado, dado que la ruta metabólica para la producción de ambas

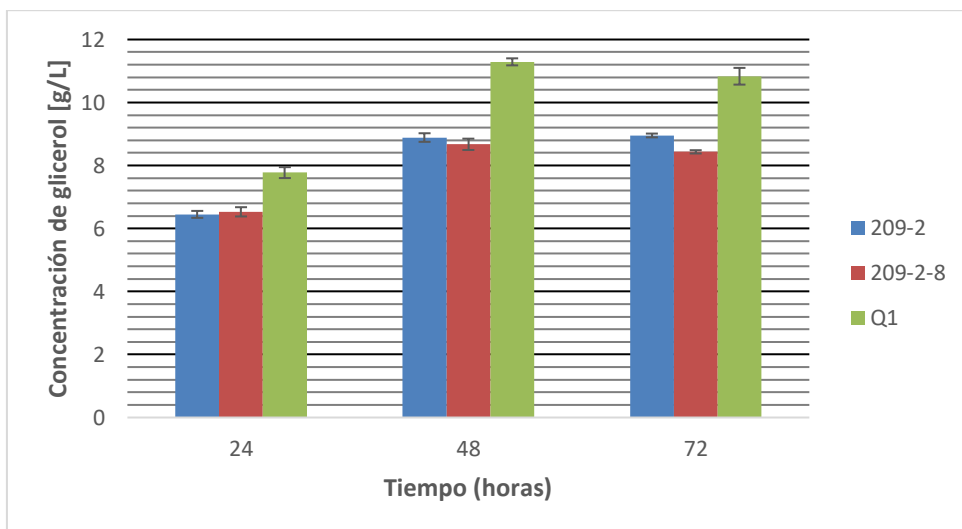
sustancias parte del mismo intermediario metabólico el acetolactato que es sintetizado por la enzima blanco de la selección que es la acetolactato sintasa.

**Figura 2-19** Comparación de la producción de alcohol isoamílico entre las cepas Q1, 209-2-8 y 209-2



Número de réplicas: 3.

**Figura 2-20** Comparación de la producción de glicerol entre las cepas Q1, 209-2-8 y 209-2

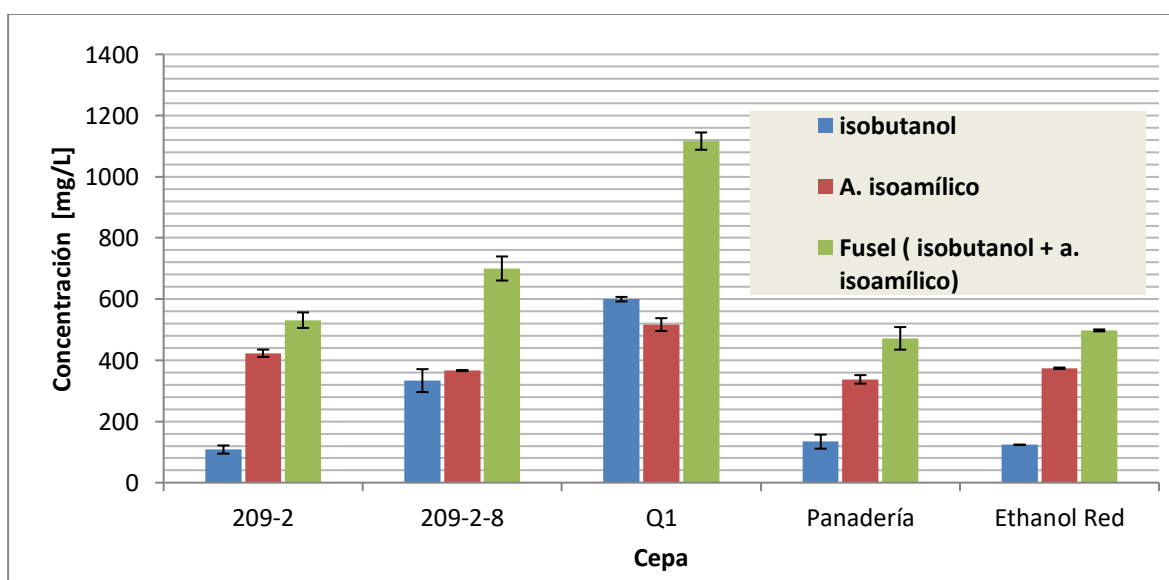


Número de réplicas: 3.

En la Figura 2-20, se muestra la producción de glicerol por las diferentes cepas, en este caso se consideró la inclusión de esta sustancia en el análisis, debido a que esta es el segundo producto más abundante durante la fermentación de azúcares por *S. cerevisiae*. Es importante notar que este caso la cepa mutante Q1 produce una mayor cantidad de glicerol que la cepa parental. En este caso es posible que algunas de las mutaciones ocurridas en el genoma de la levadura pudieran ocasionar este cambio. Este incremento en la producción de esta sustancia es consistente con la reducción en la producción de etanol observada para la cepa Q1.

Murashchenko y col. [106], encontraron que al sobreexpresar en citosol la enzima acetolactato sintasa la cepa transformada producía una mayor cantidad de glicerol que la cepa parental. Este incremento en la producción de esta sustancia fue atribuido a una menor conversión de piruvato a etanol, por lo que la cepa para re-oxidar el NADH debía hacerlo a través de la producción de glicerol. Esto pudo también estimular la producción de isobutanol en la cepa de *S. cerevisiae* objeto de ese estudio, sin embargo, este alcohol no fue medido. Este mecanismo podría explicar porque la cepa mutante que se obtuvo en el presente estudio presenta una mayor producción tanto de isobutanol como de glicerol.

**Figura 2-21** Comparación de la producción de alcoholes fusel



Número de réplicas: 3.

---

Considerando la mezcla de alcoholes fusel producida principalmente por la mezcla de alcohol isoamílico e isobutanol, se realizó un análisis comparativo de la producción total de alcoholes fusel, en este ensayo además se incluyeron las cepas Ethanol Red® y además una levadura de panadería comercial. Los resultados de este ensayo a 48 horas se muestran en la Figura 2-21.

Estos resultados permiten comprobar que la cepa mutante *S. cerevisiae* Q1 presenta una alta producción de isobutanol y también de la mezcla fusel en general, con una cantidad máxima de 1116.4 mg/L. Además, se evidencia que el principal componente de la mezcla fusel producido por la cepa Q1 es el isobutanol, seguido por el alcohol isoamílico, característica que es contraria al resto de cepas evaluadas y a los reportes existentes sobre la composición del aceite fusel. Considerando que la densidad del etanol, alcohol isoamílico e isobutanol son similares, se realiza una estimación en la que se encuentra que la proporción de alcoholes fusel estaría en 15.5 L por cada 1000 L de etanol para esta levadura evaluada en mieles, en una mezcla en la que el isobutanol es el 53.7 % en peso, estos resultados son mayores a los publicados por Patil y col. [47], quienes describen que esta relación se encuentra entre 1 a 10 L de alcoholes fusel por cada 1000L del etanol producido, para plantas industriales en las que se emplean melazas de caña de azúcar como sustrato. Estos resultados muestran el potencial que tiene la cepa *S. cerevisiae* Q1 para ser empleada en procesos industriales ya establecidos para la producción de etanol, teniéndose como ventaja que el subproducto aceite fusel está más enriquecido en isobutanol y es producido en mayor cantidad.



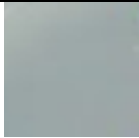

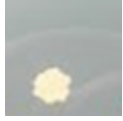









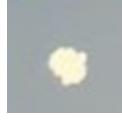


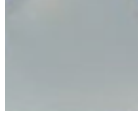
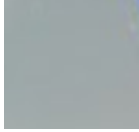





La concentración inicial de azúcar empleada para el cálculo de los rendimientos reportados en la Tabla 2-2, expresada como azúcares equivalentes a glucosa es de 160.78 g/L. El rendimiento obtenido con por la cepa *S. cerevisiae* Q1 es cercano al reportado por Chen y col. [14] de 3.86 mg de isobutanol/g de glucosa, teniendo en cuenta que la levadura obtenida por estos investigadores tuvo al menos 5 modificaciones mediante técnicas de ingeniería genética, además, se debe tener presente que el máximo alcanzado hasta el momento de elaboración de este documento fue reportado por Park y col. [62] cuyo valor es de 16.5 mg de isobutanol/g de glucosa. También se destaca que el rendimiento es 1.8 veces mayor al generado por la cepa parental 209-2-8.

**Tabla 2-2** Rendimientos obtenidos durante la fermentación con levaduras Q1 y 209-2-8

Cepa \ Rendimiento	Y <sub>P/S</sub> (mg/g) Isobutanol	Y <sub>P/S</sub> (mg/g) A. isoamílico	Y <sub>P/S</sub> (g/g) Etanol	Y <sub>P/S</sub> (g/g) Glicerol
209-2	0.673	2.630	0.456	0.0561
209-2-8	2.075	2.279	0.464	0.0535
Q1	3.730	3.214	0.453	0.0696
Panadería	0.834	2.099	0.431	0.0582
Ethanol Red®	0.770	2.325	0.443	0.0586

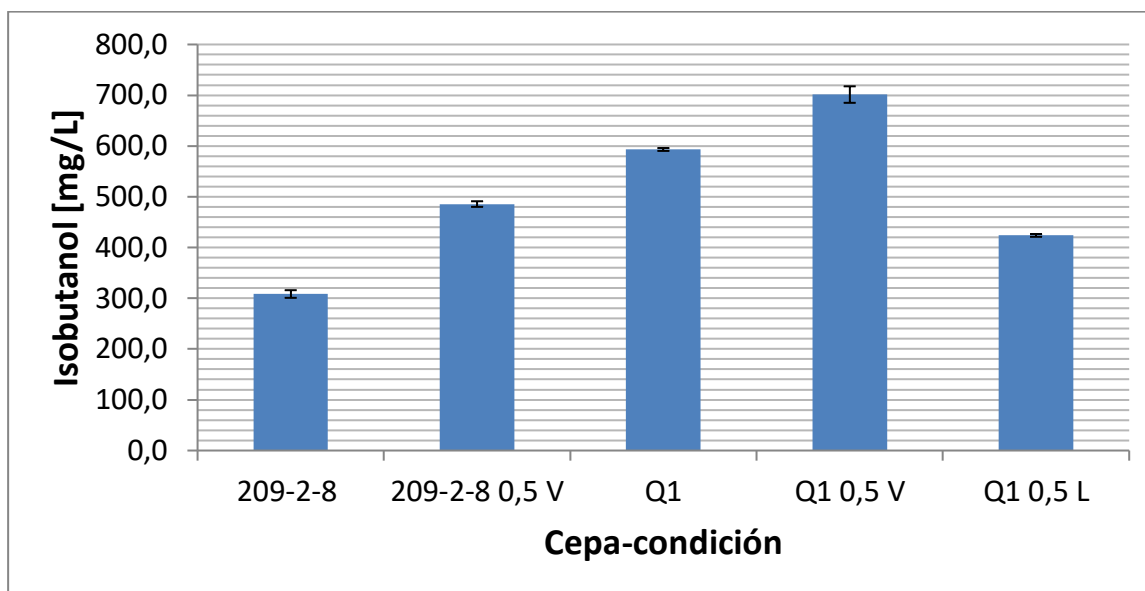
Tras varios periodos de subcultivo en agar YPD con fines de conservación las levaduras Q1, Q2, Q3, Q4 y Q5 fueron evaluadas nuevamente en su resistencia a sulfometuron metil. Los resultados de ensayo son mostrados en la Figura 2-22. De este ensayo es importante notar que la resistencia a SM adquirida mediante los ensayos de mutagénesis con MMNG, se perdió o revertió para las cepas Q2 y Q4. Esto implica que la mutación que presentaron las cepas, que permitió la resistencia a SM, fue corregida durante los procesos de subcultivo, es posible que el agar YPD al no contener SM, no ofrezca una presión selectiva adecuada sobre la población cultivada. Las otras cepas no perdieron esta capacidad, y específicamente la cepa Q1, que fue utilizada durante las subsecuentes fases de este estudio no perdió ni su resistencia a SM, ni su capacidad de producir isobutanol. Por otro lado, también con la realización de este ensayo se quiso verificar si las diferentes cepas mutantes obtenidas previamente presentaban inhibición en su crecimiento en la presencia de concentraciones más altas de SM. Como se evidencia estas levaduras (Q1, Q3 y Q5) no fueron inhibidas por una concentración tal alta de SM como de 500µg/mL. Esta condición sugiere que no se puede seguir utilizando este agente inhibidor en una subsecuente etapa adicional de mutagénesis con el fin de seguir incrementando la cantidad de isobutanol.

**Figura 2-22** Validación del crecimiento de las cepas mutantes obtenidas en medio suplementado con SM

Cepa	YNB + SA+2 % agar	YNB + SA+2 % agar+50µg/mL de SM	YNB + SA+2 % agar+100µg/mL de SM	YNB + SA+2 % agar+500µg/mL de SM
<i>S. cerevisiae</i> 209-2-8				
<i>S. cerevisiae</i> Q1				
<i>S. cerevisiae</i> Q2				
<i>S. cerevisiae</i> Q3				
<i>S. cerevisiae</i> Q4				
<i>S. cerevisiae</i> Q5				

## 2.2.4 Obtención de mutantes con auxotrofía para L-leucina

**Figura 2-23** Análisis de suplementación de L-valina o L-leucina en el medio de fermentación sobre la producción de isobutanol



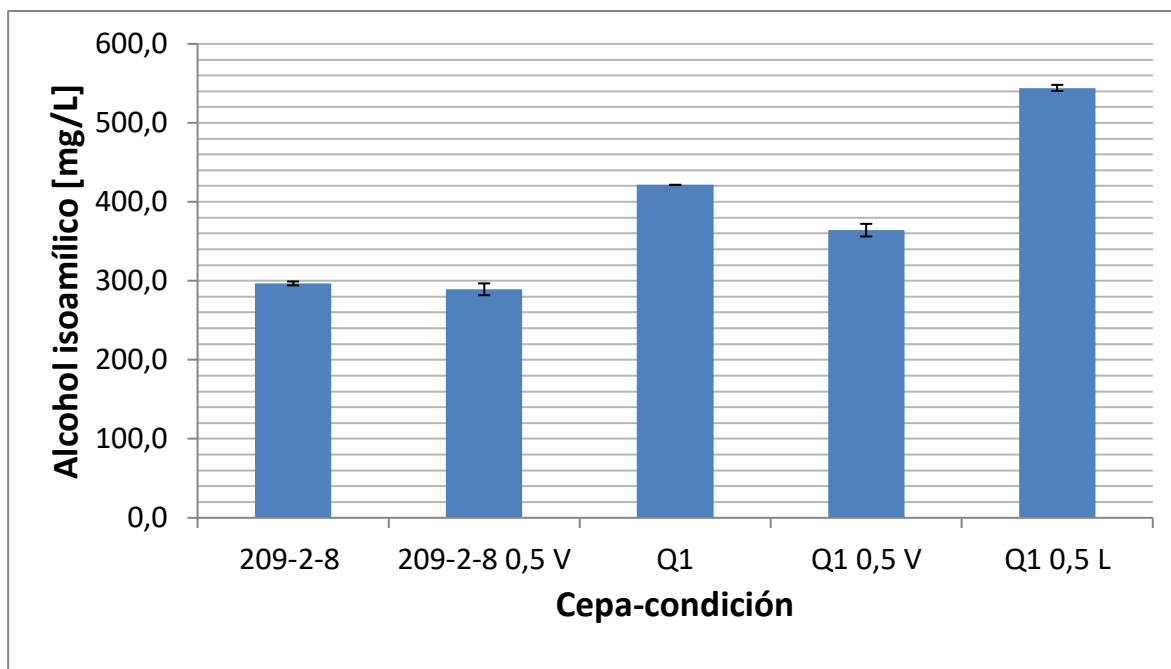
En la Figura 2-23 se muestran los resultados que se obtuvieron al suplementar los medios de fermentación con 0.5g/L de L-valina (0,5 V) o con 0.5 g/L de L-leucina (0,5 L). Este análisis fue realizado con las cepas 209-2-8 y Q1, y se desarrolló con el fin de identificar cual era el efecto que se tenía al introducir los aminoácidos sobre la producción tanto de isobutanol como de alcohol isoamílico. La gráfica muestra dos resultados muy importantes. El primero es que la adición de L-valina al medio de fermentación, no reprime la biosíntesis de isobutanol. Esto considerando que a partir de un mol de L-valina se puede producir un mol de isobutanol, el rendimiento máximo posible en ese caso sería de 0.63 g de isobutanol por g de L-valina, la máxima producción a partir de 0.5 g/L de L-valina sería de 316.3 mg/L de isobutanol. Por lo tanto, teniendo en cuenta que las dos cepas cuando son suplementadas con este aminoácido producen aún mayores cantidades de isobutanol, se puede inferir que la ruta biosintética para ambas cepas no es reprimida por la L-valina o por los intermediarios derivados de la asimilación de esta. Por otro lado, la suplementación del medio con L-leucina, específicamente para la cepa *S. cerevisiae* Q1, muestra inhibición sobre la producción de isobutanol, esto al mostrar que sin suplementación en este ensayo

la cantidad de isobutanol producido es de 593.1 mg/L y con la suplementación de este aminoácido la producción de isobutanol se reduce hasta 423.8 mg/L. Esto demuestra que la asimilación de L-leucina durante la fermentación puede inhibir la producción de isobutanol, proceso que se puede dar debido a que este aminoácido o los intermediarios metabólicos que resultan de su metabolización pueden interactuar con la ruta para la biosíntesis de isobutanol. Es posible que los intermediarios de la biosíntesis de L-leucina ejerzan control sobre la biosíntesis de isobutanol. Por esta razón, se buscó analizar el efecto de eliminar la biosíntesis de L-leucina en la cepa *S. cerevisiae* Q1.

La Figura 2-24 muestra los resultados obtenidos para la producción de alcohol isoamílico en la presencia de L-valina y de L-leucina en el medio de fermentación. Estos resultados muestran que la cepa 209-2-8 no presenta un cambio considerable en la producción de alcohol isoamílico cuando se suplementa el medio con L-valina, mientras la cepa Q1 si presenta una reducción en su producción al ser suplementada con este aminoácido, sin embargo, la producción de alcohol isoamílico no se reduce hasta el nivel producido por la cepa parental 209-2-8. Por otro lado, la producción de alcohol isoamílico se ve favorecida en la cepa Q1 cuando se suplementa el medio de fermentación con L-leucina, como se esperaba, de acuerdo con descrito por Hazelhood y Daran [13] para el catabolismo de este aminoácido.

Entre otros aspectos importantes sobre la caracterización de la cepa mutante Q1, se encuentra que al evaluar la asimilación de galactosa y al compararla con la de la cepa parental 209-2-8, esta perdió la capacidad de asimilar este azúcar (ver Anexo B), este efecto pudo ser debido a mutaciones no deseadas que se dieron producto del ensayo de mutagénesis. Por otro lado, con fines de corroboración, la identidad de la cepa Q1 también fue corroborada mediante la amplificación de la región ITS y su posterior secuenciación, los resultados también se muestran en el Anexo B.

**Figura 2-24** Análisis de la suplementación del medio de fermentación con L-valina o L-leucina sobre la producción de alcohol isoamílico



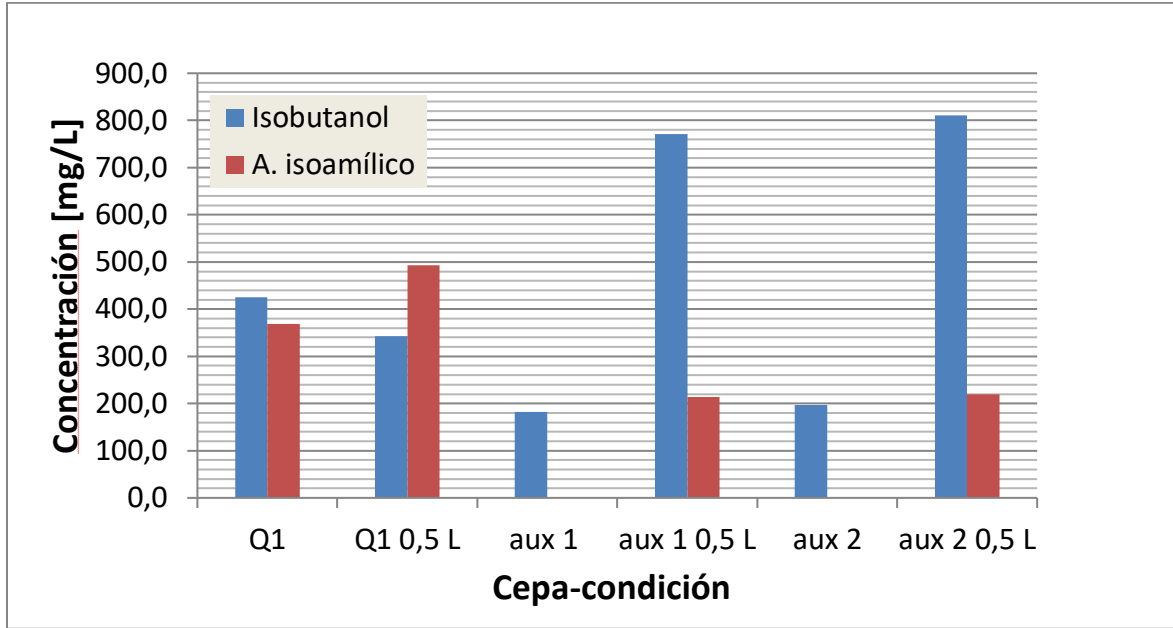
Número de réplicas: 2.

### **Obtención de una cepa de la levadura Q1 con auxotrofia para L-leucina**

En el estudio realizado por Hashitomo y col. [107], se buscó la obtención de levaduras auxótrofas para diferentes aminoácidos, en este caso las levaduras de partida fueron cepas diploides comerciales. Para este caso se utilizó como agente mutagénico luz UV, con este agente les fue posible obtener mutantes con auxotrofia, a pesar de que se presentaron con una baja frecuencia (menor al 0.1% de la población superviviente). La baja frecuencia en la obtención de mutantes de levaduras diploides con auxotrofia, se explica debido a que este fenotipo se expresa únicamente cuando todas las copias del gen que causan el genotipo, presentes en el organismo, tienen modificaciones que no les permiten ser funcionales. Por esta razón es conveniente el empleo de metodologías que permitan un enriquecimiento de los auxótrofos [88], tal como fue planteado el procedimiento propuesto, y mediante el cual fue posible obtener mutantes con auxotrofia

para L-leucina. Bajo las condiciones de mutagénesis empleadas con EMS, se obtuvo una tasa de muerte aproximada de 26 %.

**Figura 2-25** Producción de isobutanol y alcohol isoamílico por cepas auxótrofas para L-leucina



Número de réplicas: 1.

En la Figura 2-25 se muestra la producción de isobutanol y de alcohol isoamílico por parte de las cepas auxótrofas para L-leucina obtenidas a partir de la levadura Q1. Se observa que las dos levaduras auxótrofas obtenidas, no producen alcohol isoamílico (columnas aux 1 y aux 2) en un medio sin suplementación de L-leucina, esto permite corroborar que la relación existente entre la producción de alcohol isoamílico y la L-leucina. Además, como se esperaba, la fermentación no evolucionó correctamente para las dos cepas obtenidas, esto debido a que la condición de auxotrofia para L-leucina implica que el microorganismo perdió su capacidad natural de sintetizar este aminoácido, y al no estar suplementado en el medio de fermentación limitó el crecimiento de las levaduras. Por esta razón, en el mismo ensayo se utilizaron mieles suplementadas con 0.5 g/L de L-leucina. Considerando que a partir de un mol de L-leucina se puede producir un mol de alcohol isoamílico, el rendimiento máximo posible en este caso sería de 0.67 g de alcohol isoamílico por g de L-leucina, la máxima producción a partir de 0.5 g/L de L-leucina sería de 335.9 mg/L de alcohol

isoamílico. En este caso se obtiene un valor un poco inferior para ambos casos, posiblemente porque los microorganismos están incorporando parte de este aminoácido en su estructura celular. En este ensayo en particular se evidencia que la producción de isobutanol es hasta 1.9 veces más alta para la cepa auxótrofa (aux 2) en medio con L-leucina respecto a la producción por la cepa Q1, esta cepa fue denominada Q1m.

En el reporte realizado por Ofuonye y col. [61], se documenta la delección de los genes *LEU4* y *LEU9*, ambos codifican para la enzima 2-isopropilmalato sintasa, la cual es la primera enzima que interviene en la transformación del 2-cetoisovalerato hacia L-leucina. La delección de estos genes se realiza debido a que se considera que la ruta de producción de este aminoácido es una ruta competitiva a la biosíntesis de isobutanol, pues tienen el mismo intermediario metabólico (2-cetoisovalerato). Sin embargo, con la realización de estas modificaciones genéticas no se observó un incremento en la cantidad de isobutanol producido durante la fermentación. Considerando que no existen más referentes directos en los que se buscará incrementar la producción de isobutanol mediante la eliminación de la ruta de biosíntesis de L-leucina, con los que se pueda comparar los resultados obtenidos, no se puede inferir cual posible mecanismo emplean los mutantes obtenidos para incrementar la cantidad de isobutanol, puesto que puede ser debido a la redireccionamiento del flujo de carbono de glucosa a isobutanol (al no producir L-leucina se reduce la competencia por los mismos intermediarios) o a la reducción de la inhibición que causa la L-leucina o sus intermediarios sobre la biosíntesis de isobutanol, razón por la cual en este caso también se considera muy importante secuenciar el genoma completo de la levadura obtenida, con el fin de identificar porque el mutante obtenido presenta una mayor cantidad de isobutanol.

Una alternativa para realizar una caracterización de las alteraciones en los flujos de carbono que presentan los mutantes respecto a la cepa parental, que conducen a una mayor producción de isobutanol, es por medio de la realización de un análisis de flujos metabólicos. Por ejemplo, mediante el empleo de esta metodología usando glucosa radiomarcada con  $^{13}\text{C}$ , fue posible establecer las diferencias en la distribución de flujo de carbono que llevan a una mayor producción de riboflavina para una cepa mutante con

respecto a su cepa parental del mohó *Ashbya gossypii*, encontrándose cambios en los flujos a través de la ruta de las pentosas fosfato y en la distribución del piruvato citosólico que explican la mayor producción de esta vitamina. Estos hallazgos permiten definir nuevos blancos para el mejoramiento en la producción de metabolitos por parte de los microorganismos [108].

Por otro lado, considerando que el empleo de un aminoácido en un medio de fermentación industrial podría implicar un sobre costo muy alto, este resultado sugiere que a través de técnicas de ingeniería genética se atenué la biosíntesis de L-leucina, en este caso sobre la cepa *S. cerevisiae* Q1, para que se mantenga baja, pero suficiente para mantener el crecimiento celular sin requerir suplementación. Esta estrategia ha sido utilizada exitosamente para incrementar la cantidad de riboflavina producida por el mohó *A. gossypii* [109], pues la producción de esta sustancia se encuentra regulada por la presencia de AMP cíclico, este intermediario es sintetizado en este caso por el gen *ADE12* (involucrado en la biosíntesis de purinas), por lo que inicialmente se estudió que efecto tendría la delección del gen, propuesta que resultó exitosa, sin embargo, reconociendo que el uso de auxótrofos a nivel industrial no es conveniente, ellos redujeron la expresión del gen en lugar de realizar la delección, para ello sustituyeron exitosamente el promotor del gen, logrando una reducción de 70 veces la expresión del gen.

González-Ramos y col. [110], identificaron algunos genes involucrados en la mayor tolerancia de una levadura al n-butanol presente en un medio de fermentación. Para ello, la cepa que obtuvieron con mayor tolerancia fue cruzada con una cepa de referencia, la cepa obtenida fue esporulada y las cepas haploides derivadas de este cruce se analizaron para identificar cuales segregantes mantenían la tolerancia a isobutanol. El estudio de segregación se realizó con tres generaciones, permitiendo facilitar la identificación de los genes que mutaron que causaron la mayor tolerancia al n-butanol, esto junto con la secuenciación del genoma de las cepas obtenidas durante el estudio. Una estrategia similar fue utilizada por Swinnen y col. 2012 [111], para la identificación de genes que determinan una mayor tolerancia al etanol y por González-Ramos y col. [112], para identificar genes que determinan tolerancia a ácido acético presente en hidrolizados lignocelulósicos. Una estrategia similar podría ser utilizada con el fin de identificar las

mutaciones que causan que las cepas resistentes a SM presenten una mayor producción de isobutanol.

Sin embargo, dado que la cepa parental del estudio la *S. cerevisiae* 209-2-8 no puede esporular y su genoma no está secuenciado, esta metodología no puede ser implementada aún de manera directa. Como una alternativa para abordar la condición de nula capacidad de esporulación, podría ser recomendable emplear una metodología conocida como *rare-mating*, la cual consiste en la conjugación de una cepa haploide (MATa ó MAT $\alpha$ ), la cual lleva un marcador, el cual puede ser de auxotrofia, con una cepa diploide (ó aneuploide ó poliploide) la cual debe ser o convertirse en *petite*. Los cultivos de las dos cepas son mezclados e incubados por varios días. Después las levaduras son cultivadas en agar YNB con etanol o glicerol, el cual genera una doble presión selectiva, pues no permite el desarrollo de levaduras auxotróficas ni tampoco el desarrollo de levaduras *petite*, que no le presentan una mitocondria funcional y por lo tanto no pueden crecer sobre fuentes no fermentables de carbono como el etanol o el glicerol. Esta metodología puede permitir que las levaduras obtenidas presenten una mayor capacidad de esporulación [113]. Esta metodología ha sido empleada exitosamente para la obtención de levaduras que permitan la diversificación y el mejoramiento sensorial de vinos [114], [115].

Finalmente, se menciona que se intentaron obtener mutantes desde la levadura *S. cerevisiae*, empleando como agente mutagénico Luz Ultravioleta, con una lámpara germicida (LUMEK®) de 45 cm de longitud, 15 W de potencia, de onda corta (254 nm). Con un tiempo de exposición de 40 segundos, se obtuvieron tasas de muerte del 92%, las cuales son adecuadas para la obtención de mutantes. El medio de selección empleado era YNB suplementado con 20g/L de norvalina, sin sulfato de amonio, en este caso no se obtuvieron mutantes.

## 2.3 Conclusiones

Las cepas nativas de *S. cerevisiae* evaluadas a partir del cepario previamente obtenido presentaron diferente capacidad de producción de isobutanol empleando mieles de caña

de azúcar diluidas a 16 °Bx, siendo las levaduras 107-4 y 204-2 las que presentaron la mayor producción. Sin embargo, la cepa 209-2-8 obtenida de manera imprevista, fue seleccionada para los posteriores estudios de mutagénesis al presentar una alta capacidad de producir isobutanol y etanol, condición que pudo ser estimulada por su posible carácter *petite*.

La combinación de mutagénesis con MNNG (50µg/mL con 20 min) seguida de la selección en un medio de cultivo con sulfometuron metil (50µg/mL) permitió obtener 5 mutantes con mayor producción de isobutanol que la cepa parental. La cepa mutante obtenida *S. cerevisiae* Q1 presentó la mayor producción de isobutanol a partir de mieles de caña de azúcar diluidas a 16 °Bx, alcanzando una concentración de isobutanol de 580.8 mg/L  $\pm$  28.1, la cual fue 1.92 veces mayor que la producida por la cepa parental y con un rendimiento de 3.73mg de isobutanol/g azúcares expresados como glucosa. Esta incrementada capacidad de producir isobutanol puede ser debida a una menor regulación en la ruta que conduce a la biosíntesis de L-valina en la levadura mutante Q1. Sin embargo, al emplear como agentes de selección a los compuestos inhibitorios D,L norvalina y 4-aza-D,L-no fue posible obtener mutantes con mayor producción de isobutanol de la cepa *S. cerevisiae* 209-2-8.

Mediante la combinación de mutagénesis con EMS (5 %v/v) y el subsecuente enriquecimiento con nistatina, fue posible obtener una cepa mutante con auxotrofia empleando como cepa parental la *S. cerevisiae* Q1, la cual incremento 1.4 veces su nivel de producción respecto a la cepa Q1, alcanzando 811.0 mg/L de isobutanol. Este incremento pudo ser debido a una reducción de la inhibición causada por el aminoácido L-leucina sobre la biosíntesis de L-valina causando una mayor producción de isobutanol.

### 3.Efecto de la concentración de nutrientes y el nivel de pH sobre la producción de isobutanol

La composición y el nivel de pH del medio son variables que afectan los procesos de fermentación. Con el fin de determinar las condiciones que permitan alcanzar los niveles más convenientes para variables de proceso como la concentración de producto final, el rendimiento, la selectividad o el costo de materias primas, en general se requiere de la realización de procedimientos experimentales [116]. Los diseños experimentales han mostrado ser una herramienta útil en la identificación de estas condiciones [117]. El diseño Plackett-Burman es uno de los diseños más frecuentemente utilizados para la identificación de los factores más importantes que influyen los bioprocesos. Por ejemplo, este diseño ha sido utilizado para la determinación de condiciones para la degradación de fenol por el alga *Chlorella pyrenoidosa* [118], para mejorar la producción de glutatión por la bacteria *Lactobacillus plantarum* [119], y para mejorar la producción de etanol por la levadura *S. cerevisiae* [120]. Los diseños Plackett-Burman son diseños factoriales fraccionados en los que se evalúan dos niveles por cada factor. El número de corridas  $N$  a realizar corresponde a  $N-1$  factores a analizar, en donde  $N$  en general es un múltiplo de 4 [121], este diseño se ajusta a un modelo polinomial de primer orden, por lo tanto, no considera interacciones entre los factores, es decir considera que los efectos son aditivos [117]. El modelo ajustado presenta la siguiente ecuación:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon$$

En donde  $k$  corresponde al número de factores a estudiar,  $\beta_0$  corresponde al término constante,  $\beta_i$  son los coeficientes de la regresión,  $x_i$  es la variable que representa al factor estudiado, y  $\varepsilon$  es el error residual asociado a los experimentos [122].

Una vez los factores más importantes son identificados, se busca determinar los niveles de estos factores que permiten alcanzar los mejores niveles de las variables respuesta. Para ello, pueden ser empleadas metodologías de superficie de respuesta, las cuales involucran también diseños experimentales [122]. Entre los diseños experimentales empleados para este fin se destaca el diseño Box-Behnken, el cual emplea 3 niveles por cada factor, además permite determinar los coeficientes de primer y de segundo orden, con el menor número de corridas [123]. La aplicación del diseño Box-Behnken ha permitido determinar condiciones que permiten incrementar la producción de  $\alpha$ -amilasa por la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* [124], también incrementar la producción de  $\beta$ -glucosidasa por el hongo *Paecilomyces variotii* [125], y mejorar la producción de hidrógeno por la bacteria *Ethanoligenens harbinense* [126].

El modelo ajustado presenta la siguiente ecuación:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

En donde  $\beta_{ii}$  son los coeficientes de la regresión cuadráticos y  $\beta_{ij}$  representan los coeficientes de interacción de parámetros [122].

Considerando que no se encuentra publicada información sobre los factores que inciden en particular sobre la producción de isobutanol, con esta investigación se emplearon diseños experimentales con el fin de identificar estos factores y sus niveles más adecuados, tomando como base un medio químicamente definido. Se tomó como referencia la composición del medio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) comercial y los medios empleados por Verduyn y col. [127], [128]. Este análisis se realizó con el fin de identificar que nutrientes se pueden suplementar o modificar, y a qué nivel de pH se estimula la mayor producción de isobutanol durante la fermentación alcohólica. Con la información obtenida

en esta fase del estudio se sugieren cuales factores pueden ser tenidos en cuenta cuando se evalúan medios industriales para la producción de isobutanol.

## 3.1 Materiales y métodos

### **Microorganismo**

Se empleó la cepa de levadura *S. cerevisiae* Q1, la cual fue obtenida mediante ensayos de mutagénesis y selección con SM. Los cultivos de la cepa fueron mantenidos bajo refrigeración a 4 °C en agar YPD (*Yeast extract, peptone, dextrose*) en el laboratorio 218, del edificio 412 de la Universidad Nacional de Colombia.

### **Medios de crecimiento**

El medio de crecimiento YPD se preparó con la siguiente composición: 20 g/L peptona, 10 g/L extracto de levadura, 20 g/L de glucosa y 20 g/L de agar-agar. El medio se esterilizó utilizando una autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El medio fue dosificado en cajas estériles bajo condiciones de asepsia y almacenado para su posterior uso.

El medio YMm (*Yeast Malt modified*) fue preparado con la siguiente composición: 50 g/L de glucosa, 5 g/L peptona, 3 g/L extracto de levadura, 3 g/L extracto de malta, 1 g/L de NH<sub>4</sub>Cl y 0.4 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El medio fue dosificado en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio. El medio se esterilizó utilizando una autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### **Medios de fermentación**

Para la evaluación de los factores más importantes a estudiar en el diseño Plackett-Burman, se seleccionaron como los niveles bajos de los nutrientes del diseño, los valores de concentración del medio YNB (sin sulfato de amonio ni aminoácidos). Para el sulfato de amonio se ajustó el nivel bajo de concentración en 2g/L, mientras el nivel bajo de pH fue

fijado en 4.0. Los niveles altos fueron ajustados a partir de soluciones stock concentradas de cada nutriente. Los nutrientes evaluados y los valores de los niveles estudiados para los mismos se pueden consultar en la Tabla 3-1. La concentración de la glucosa para todos los medios fue ajustada a 160 g/L, además todos los medios de fermentación fueron suplementados con ergosterol y Tween® 80, en concentraciones finales en los medios de cultivo de 10 mg/L y 420 mg/L, respectivamente [127]. El volumen del medio fue completado a 50 mL en un balón aforado con previo ajuste del nivel de pH. Los medios fueron finalmente esterilizados por filtración, mediante filtros de 0.22µm para jeringa de la referencia Ministart® 16534-K de Sartorius; además, el frasco receptor para el filtrado estéril fue previamente esterilizado en autoclave. Para la evaluación de este diseño se realizaron 3 réplicas, cada una realizada en un bloque separado. Las corridas realizadas fueron generadas y analizadas por el software Minitab 16.

**Tabla 3-1** Niveles de los factores evaluados en el diseño Plackett-Burman

Factor	Símbolo	Valor experimental	
		Bajo (-1)	Alto (+1)
Sulfato de amonio (g/L)	S.A.	2	5
Fosfato diácido de potasio (g/L)	P.A.	1	5
Sulfato de magnesio (g/L)	S.Mg.	0.1	0.2
Sulfato de zinc (mg/L)	S.Zn.	0.16	1.1
Sulfato ferroso (mg/L)	S.Fe.	0.0689	0.7
Sulfato de manganeso (mg/L)	S.Mn.	0.145	0.5
Tiamina (µg/L)	Tia.	400	2000
Piridoxina (µg/L)	Pir.	400	2000
Pantotenato de calcio (µg/L)	Pan.	400	2000
Biotina (µg/L)	Bio.	2	50
pH	pH	4	5.5

Para la evaluación de los niveles de los factores seleccionados para el diseño Box-Behnken, la preparación de los medios fue similar a la previamente descrita. Sin embargo, al realizar un ensayo preliminar a niveles altos de pH, se evidenció la presencia de turbidez

en el medio, por lo que a los medios se les suplementó EDTA disódico a una concentración final de 15 mg/L [128], con este ajuste, los medios no presentaron turbidez. Los factores y los niveles estudiados para cada factor en este diseño experimental son presentados en la Tabla 3-2. Estos factores y niveles fueron seleccionados una vez fue realizado y analizado el diseño Plackett-Burman. Las corridas fueron generadas por el software Minitab 16, empleando 3 réplicas para el punto central.

**Tabla 3-2** Niveles empleados en el diseño factorial fraccionado Box-Benhken

Factor	Valor experimental		
	Bajo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
Fosfato diácido de potasio (g/L)	1	5	9
Biotina (µg/L)	2	50	98
pH	5.0	5.5	6.0

Procedimiento para el desarrollo de inóculo y fermentación

Para el desarrollo del inóculo de fermentación se tomó una colonia con un asa estéril desde un cultivo fresco de levaduras crecidas en agar YPD. La colonia se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio YM modificado y estéril. El cultivo se mantuvo a 30 °C por 24 horas en un agitador orbital a 150 rpm bajo condiciones aeróbicas. Una vez culminada la incubación, las células fueron colectadas de manera aséptica por centrifugación a 8500 rpm, fueron lavadas dos veces con agua desionizada estéril y resuspendidas en agua desionizada para ser empleadas como inóculo para la fermentación.

Para los ensayos de fermentación se empleó un inóculo concentrado de 0.5 mL, con el fin de evitar la dilución de los nutrientes presentes en el medio. Con este inóculo la concentración inicial de las levaduras en el medio fue de aproximadamente  $5.0 \cdot 10^7$  células/mL.

Los experimentos de fermentación fueron llevados a cabo en frascos tapa rosca de 50 mL de capacidad empleando 50 mL de medio de fermentación estéril. A las tapas de estos frascos se les adaptó un sistema *airlock* el cual facilita la evacuación de los gases producidos durante la fermentación, pero no permite el ingreso de aire. Por lo tanto, se genera una condición anaeróbica durante el proceso de fermentación. Para los ensayos de fermentación, se empleó una cámara de incubación con temperatura regulada a 30 °C. Al interior de la cámara se dispuso una plancha de agitación magnética multipozos, para la realización simultánea de varias fermentaciones. Con la agitación se impedía la floculación de las cepas durante el proceso. El tiempo de proceso fue de 48 horas.

### **3.1.1 Determinación del contenido de alcoholes y azúcares**

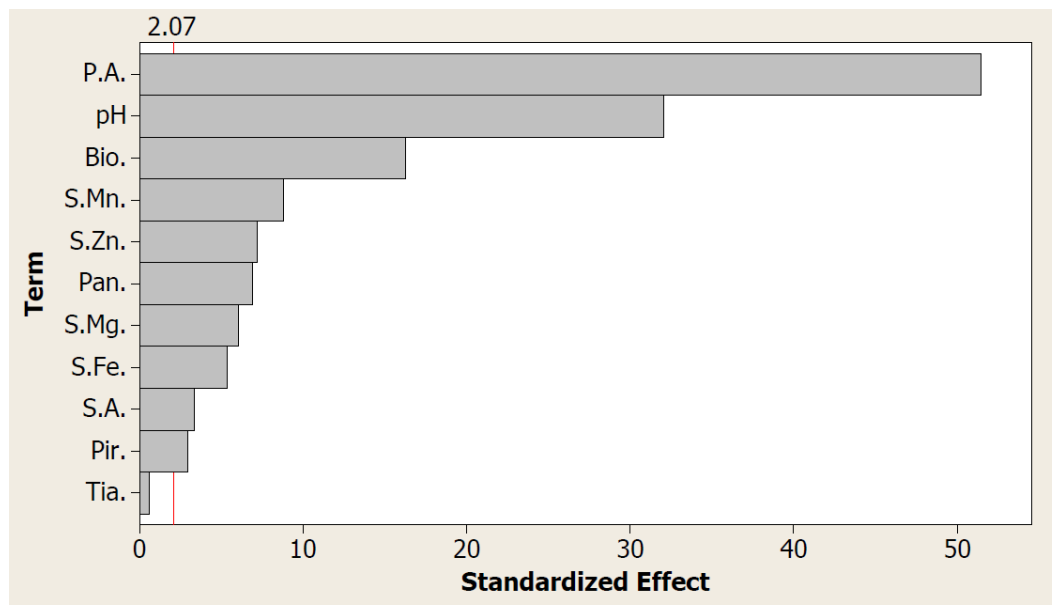
La glucosa y los productos de fermentación (isobutanol, etanol, glicerol, alcohol isoamílico y ácido acético) fueron cuantificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello se siguió el método descrito por Avalos y col. [60] con ligeras modificaciones. En el análisis se utilizó una columna Aminex HPX-87H de Biorad. La separación se realizó con el horno a una temperatura de 65°C. La fase móvil empleada fue H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM con un flujo de 0.6 ml/min, se utilizó un detector de índice de refracción operando a una temperatura de 40 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 20µL. Se elaboraron curvas de calibración con soluciones de concentración conocida preparadas con estándares de cada sustancia. Algunas de las curvas de calibración utilizadas para la cuantificación pueden ser consultadas en el Anexo A.

## **3.2 Resultados y discusión**

Los resultados obtenidos para el diseño Plackett-Burman son presentados en la Figura 3-1 a través de un diagrama de Pareto, y en la Tabla 3-3 en donde se presentan los coeficientes obtenidos del modelo generado por el software. Este diseño se realizó con el fin de identificar cuales nutrientes al ser suplementados afectan más la producción de isobutanol, y si el nivel de pH también afecta la producción de esta sustancia.

Al analizar el diagrama de Pareto de los efectos estandarizados (reportado por el software Minitab 16), se puede ver que para un nivel de significancia de 0.05, los factores que influyen la producción de isobutanol, son todos con excepción de la tiamina, esto también puede ser verificado en la Tabla 3-3. Los tres factores que tienen la mayor influencia sobre la producción de isobutanol son la concentración de fosfato diácido de potasio (simbolizada como P.A.), el nivel de pH y la concentración de biotina (simbolizada como Bio.). Estos factores en sus niveles altos estimulan la producción de isobutanol, lo cual se puede verificar analizando los signos de los coeficientes para estos factores, los cuales fueron positivos.

**Figura 3-1** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados obtenido en la evaluación de diseño Plackett-Burman ( $\alpha=0.05$ )



El coeficiente de regresión  $R^2$  obtenido para el modelo, el software lo reporta en 99.48%, lo cual implica que el modelo generado para el diseño evaluado explica en un alto nivel la variable respuesta (Ver Anexo C para visualizar).

Por estas razones, se procedió a utilizar estos tres factores para su análisis a través de un diseño experimental Box-Behnken, con el fin de identificar en que niveles de estos factores se favorece una mayor producción de isobutanol.

**Tabla 3-3** Coeficientes del modelo obtenido para el diseño Plackett Burman

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Error estándar del coeficiente</b>	<b>Valor-t</b>	<b>Valor-P</b>
Sulfato de amonio (S.A.)	-2.406	0.7165	-3.36	0.003
Fosfato diácido de potasio (P.A.)	36.861	0.7165	51.45	0.000
Sulfato de magnesio (S.Mg.)	-4.333	0.7165	-6.05	0.000
Sulfato de zinc (S.Zn.)	-5.144	0.7165	-7.18	0.000
Sulfato ferroso (S.Fe.)	3.839	0.7165	5.36	0.000
Sulfato de manganeso (S.Mn.)	-6.300	0.7165	-8.79	0.000
Tiamina (Tia.)	-0.417	0.7165	-0.58	0.567
Piridoxina (Pir.)	-2.111	0.7165	-2.95	0.007
Pantotenato de calcio (Pan.)	4.967	0.7165	6.93	0.000
Biotina (Bio.)	11.667	0.7165	16.28	0.000
pH	22.950	0.7165	32.03	0.000

Al analizar los demás factores estudiados al realizar el diseño Plackett-Burman, se encuentra que los que presentaron coeficientes positivos fueron el sulfato ferroso y el pantotenato de calcio, razón por la cual estos nutrientes se incluyeron en sus niveles altos en los medios de cultivo a ser evaluados en el posterior diseño experimental Box-Behnken. Para el caso de los factores con coeficientes negativos, que incluyeron a los sulfatos de amonio, magnesio, zinc, manganeso y piridoxina, estos componentes no fueron suplementados a los medios en el posterior diseño, es decir, fueron evaluados en sus niveles bajos. La tiamina al no resultar ser un factor significativo no fue suplementada en el posterior diseño. Con esta selección de los niveles a utilizar para los demás factores en

el diseño Box-Behnken, se permitió asegurar que los medios a evaluar permitieran la mayor producción de isobutanol.

Considerando los resultados obtenidos se puede inferir que la cantidad de tiamina presente en el medio YNB, es suficiente para cubrir los requerimientos del microorganismo, específicamente para asegurar la correcta actividad de la enzima piruvato descarboxilasa, la cual como se ha mencionado anteriormente no solo cataliza la descarboxilación del piruvato, sino también la del  $\alpha$ -cetoisovalerato, el cual es un intermediario clave para la producción de isobutanol.

Gutierrez y col. [129], estudiaron el efecto de la deficiencia de las vitaminas biotina, tiamina, ácido pantoténico, piridoxal y de los micronutrientes zinc, boro, hierro y manganeso, sobre la producción de alcoholes superiores durante la fermentación de sacarosa por una cepa industrial de *S. cerevisiae*, empleada para la producción de etanol. En ese estudio, se mostró que la deficiencia de estas vitaminas no causa una reducción en la producción de etanol, sin embargo, se muestra que la deficiencia de ácido pantoténico y tiamina, conducen a una mayor producción de isobutanol, mientras la deficiencia de piridoxina causa una mayor producción de la mezcla de alcoholes amílicos. Respecto a la deficiencia de micronutrientes encontraron que solo la deficiencia de zinc afectaba de manera negativa la producción de isobutanol y la mezcla de alcoholes amílicos. Cabe resaltar que en ese estudio los niveles estudiados de las vitaminas estuvieron en 3mg/L con excepción de la biotina que fue trabajada con 0.3 mg/L, mientras en el presente estudio los valores analizados estuvieron por debajo de este rango. Esta podría ser una causa por la cual los resultados obtenidos en el presente estudio son diferentes respecto a la importancia del zinc, del pantotenato de calcio y la tiamina para la producción de isobutanol, además considerando que los estudios emplean cepas distintas que pueden presentar requerimientos distintos respecto a estos nutrientes.

Una alternativa para identificar a través de cual mecanismo estos factores estimulan la producción de isobutanol, puede ser a través de un análisis transcriptómico, por ejemplo, mediante la tecnología RNA-seq la cual puede ser aplicada para identificar cuales genes modifican su expresión bajo condiciones distintas de cultivo y de esta manera entender que procesos celulares se ven afectados [130].

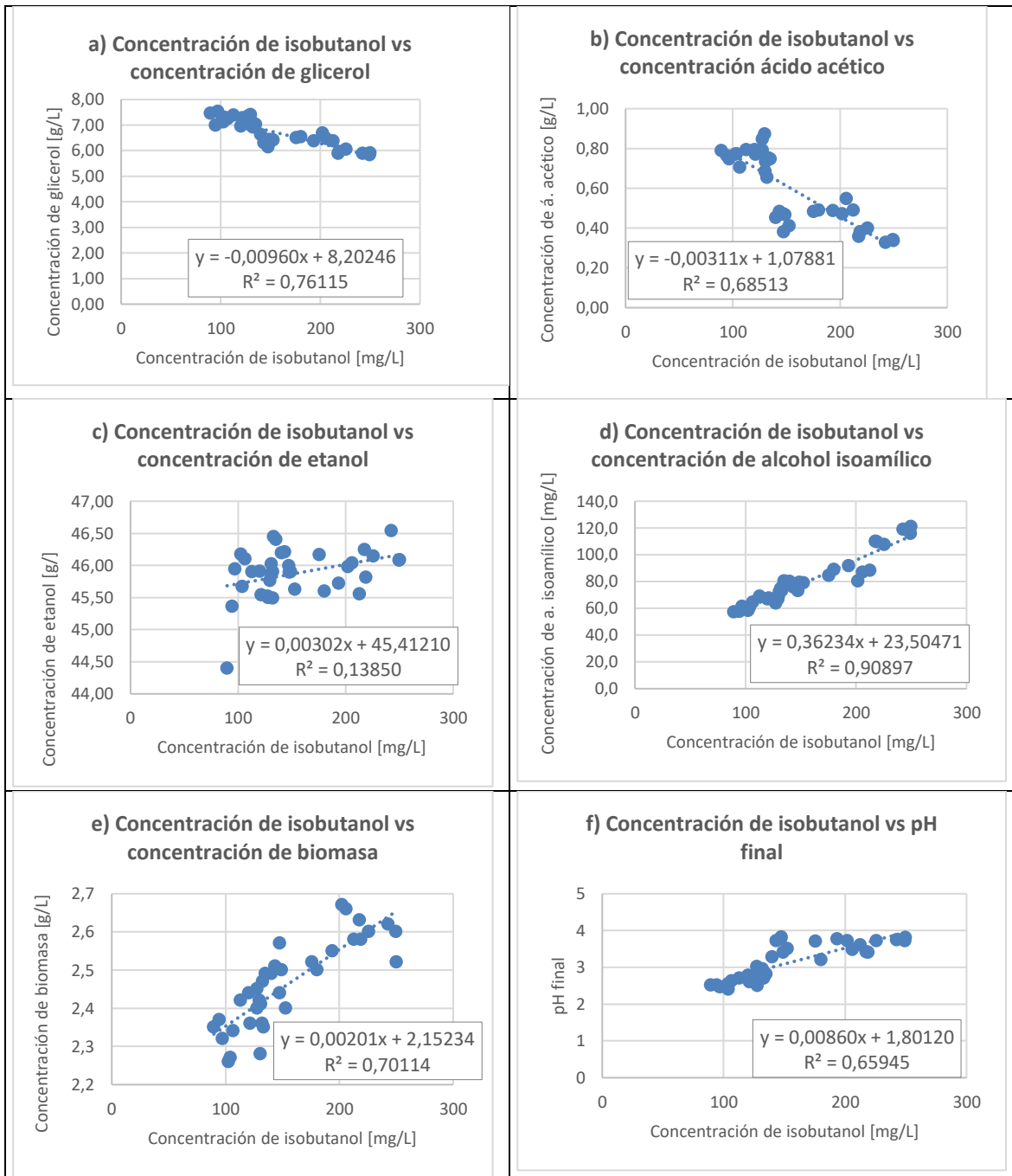
Bohlscheid y col. [131], estudiaron la influencia de la interacción de la concentración de nitrógeno y la concentración de biotina sobre el rendimiento de dos cepas vínicas. Encontraron que concentraciones por debajo de 1 µg/L de esta vitamina estimulan la producción de isobutanol durante la fermentación. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el presente estudio, considerando que el efecto de incrementar la concentración de esta vitamina resultó ser positivo para la producción de isobutanol. Al consultar la literatura, de manera directa no se ha estudiado el efecto del nivel de pH y de la concentración de fosfato diácido de potasio sobre la producción de isobutanol, razón por la cual no contrastan los resultados obtenidos contra otros referentes experimentales.

Por otro lado, al correlacionar la producción de isobutanol con la de los otros metabolitos producidos durante la fermentación y el nivel de pH final, se obtienen las gráficas mostradas en la Figura 3-2. Los coeficientes de determinación obtenidos para todos los pares de variables muestran que existe una relación moderadamente alta entre las diferentes variables estudiadas, con excepción de la relación entre la producción de isobutanol y la producción de etanol, en la que la relación es baja. La relación es inversamente proporcional entre la producción de isobutanol y la producción de glicerol, también respecto a la producción de ácido acético.

Esto sugiere que las condiciones que estimulan la producción de isobutanol limitan la producción de estas sustancias. En el estudio realizado por Romano y col. [132], se analizó la producción de acetaldehído, ácido acético y alcoholes fusel durante la fermentación por parte de varias cepas de *S. cerevisiae* empleadas en la producción de vino. Como resultado encontraron que las cepas que presentaban una mayor producción de acetaldehído y ácido acético presentaban la menor producción de alcoholes superiores, y viceversa, esta relación no afectó la producción de etanol por las cepas vínicas. Estos resultados son consistentes para los obtenidos en el presente estudio. Por otro lado, considerando la producción de ácido acético competitiva a la producción de isobutanol, Park y col. [52], realizaron varias modificaciones genéticas para mejorar la producción de isobutanol por una cepa de *S. cerevisiae*. En particular estudiaron la delección del gen *ALD6*, el cual codifica para la enzima acetaldehído deshidrogenasa, encargada de la producción de ácido acético desde acetaldehído, encontraron que dicha modificación

permitía una mayor producción de isobutanol por esta cepa. Reforzando la hipótesis de que la producción de ácido acético compete con la producción de isobutanol.

**Figura 3-2** Relación entre la producción de isobutanol y los otros productos de fermentación y el nivel de pH final



Para el caso de la relación entre la producción de glicerol y la de isobutanol, existen también reportes de este comportamiento competitivo. Por ejemplo, en el estudio realizado por Jain y col[133], tras realizar deleciones que impedían la producción de glicerol durante la fermentación, encontraron que la cepa modificada también presentaba una mayor cantidad de isobutanol, corroborando este comportamiento. Hazelwood y col. [13], sugieren que este comportamiento puede ser debido a que la producción de alcoholes fusel es una alternativa para la regeneración del cofactor NADH durante la fermentación, la cual a su vez es una de las funciones fisiológicas de la producción de glicerol durante el metabolismo anaeróbico de los azúcares.

La relación es directamente proporcional entre la producción de isobutanol y la producción de biomasa, así como con la producción de alcohol isoamílico. Esto muestra que la producción del isobutanol y el alcohol isoamílico están relacionadas con un estímulo del anabolismo, el cual también permite la producción de una mayor cantidad de biomasa celular. Por último, la Figura 3-2 f, muestra que los factores que estimulan la producción de isobutanol, limitan el descenso del pH. Este comportamiento, además, puede ser explicado por la Figura 3-2 b, pues una menor producción de ácido acético puede causar un menor descenso del pH.

### **Resultados de diseño de Box-Behnken**

Los resultados obtenidos en la aplicación del diseño Box-Behnken son presentados en la Tabla 3-4. Los niveles centrales escogidos para los factores fueron seleccionados tomando como referencia los niveles que permitieron una mayor de isobutanol en la evaluación del diseño Plackett-Burman.

Así mismo, al analizar los datos obtenidos para la producción de isobutanol mediante el software Minitab16, se obtienen los coeficientes para el modelo. Estos coeficientes son presentados en la Tabla 3-5.

Para este caso el valor reportado por el software para el coeficiente de regresión  $R^2$  fue de 98.84%, lo cual implica que el modelo generado para el diseño explica un alto nivel de variación generado por la variable respuesta (Ver Anexo C para visualizar el reporte completo entregado por el software).

**Tabla 3-4** Resultados de la corridas evaluadas en la aplicación del diseño experimental Box-Behnken

Número de corrida	Nivel de fosfato ácido de potasio	Nivel de biotina	Nivel de pH	Concentración de glicerol [g/L]	Concentración de etanol [g/L]	Concentración de isobutanol [mg/L]	Concentración de alcohol isoamílico [mg/L]
1	-1	1	0	8.82	45.18	124.0	56.8
2	0	1	1	8.32	65.01	374.8	188.0
3	1	-1	0	7.98	63.87	308.8	162.9
4	-1	0	-1	8.72	45.29	104.7	51.7
5	0	-1	-1	8.40	63.30	233.3	142.4
6	0	0	0	8.26	63.46	310.0	165.9
7	0	1	-1	8.42	63.21	291.2	133.9
8	0	-1	1	8.38	64.56	290.3	135.9
9	-1	0	1	8.96	53.35	166.0	101.7
10	1	1	0	8.08	65.09	372.5	185.6
11	1	0	1	7.98	64.77	421.3	170.4
12	0	0	0	8.08	65.40	327.3	173.7
13	1	0	-1	8.41	67.14	274.2	136.8
14	0	0	0	8.48	64.94	340.7	186.3
15	-1	-1	0	8.40	44.01	112.2	53.4

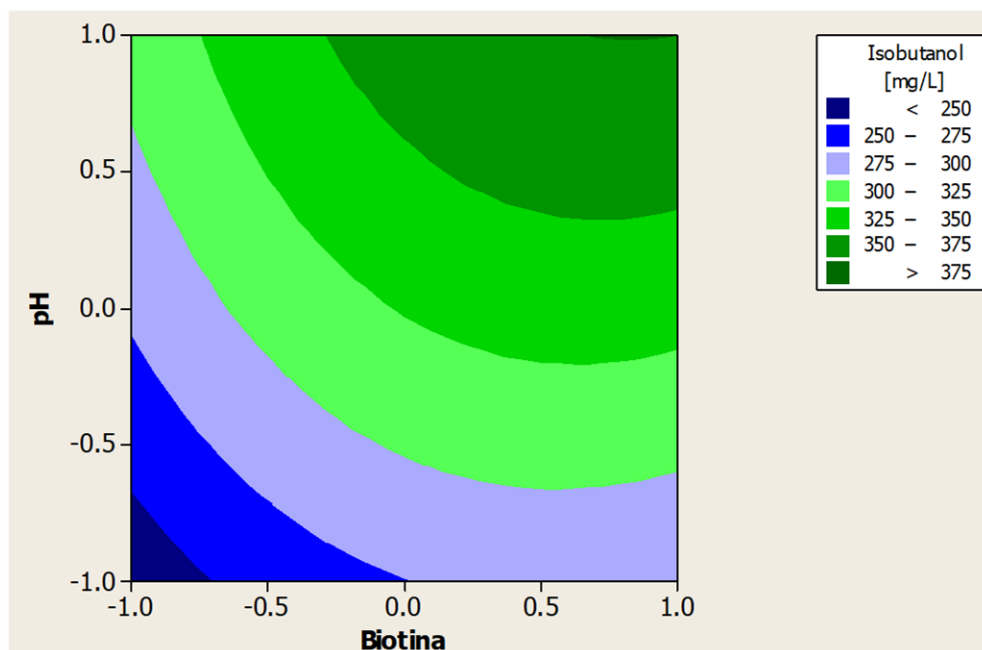
**Tabla 3-5** Coeficientes del modelo obtenido para diseño Box Behnken

Termino	Coeficiente	Error estándar del coeficiente	Valor-t	Valor-P
Fosfato diácido de K	108.723	6.436	16.893	0.000
Biotina	27.219	6.436	4.229	0.008
pH	43.633	6.436	6.780	0.001
Fosfato diácido de K ^ 2	-76.222	9.473	-8.046	0.000
Biotina ^ 2	-20.380	9.473	-2.151	0.084
pH ^ 2	-8.167	9.473	-0.862	0.428
Fosfato diácido de K* biotina	12.983	9.102	1.426	0.213
Fosfato diácido de K* pH	21.441	9.102	2.356	0.065
Biotina* pH	6.667	9.102	0.733	0.497

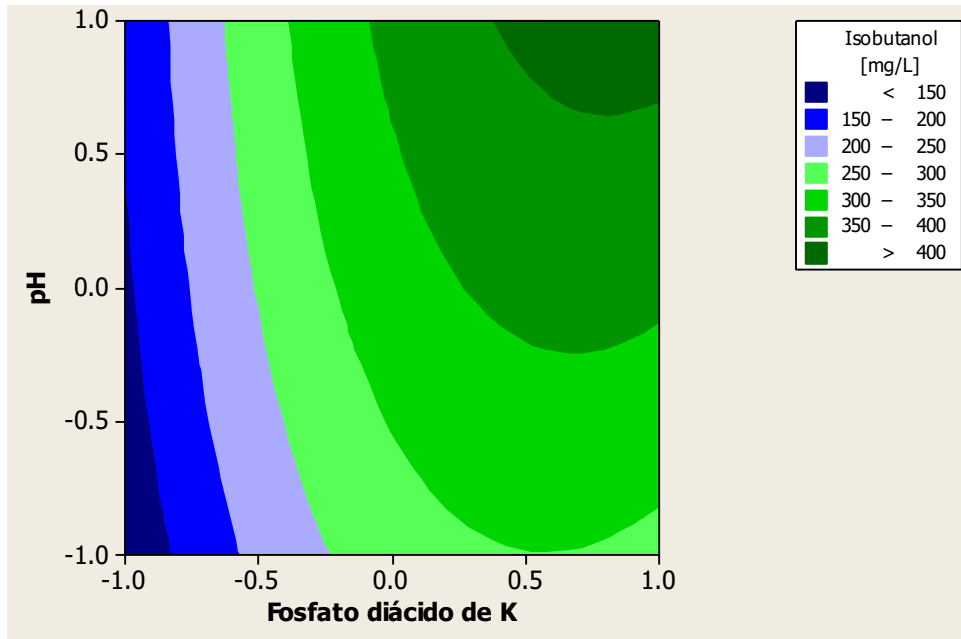
De acuerdo con los datos obtenidos y presentados en la Tabla 3-5, se puede observar que el fosfato diácido de potasio es el factor que influencia en mayor medida la producción de isobutanol. Además, se puede notar que todos los coeficientes de primer orden para factores analizados resultaron ser significantes, considerando un nivel de significancia de 0.05.

Mediante la generación de las gráficas de contorno es posible observar que niveles de los factores permiten incrementar la producción de isobutanol durante el proceso de fermentación. En las Figuras 3-3, 3-4 y 3-5, se presentan las gráficas de contorno para la concentración de isobutanol, como función de la concentración de biotina, de la concentración de fosfato diácido de potasio y del nivel de pH. La Figura 3-3 sugiere que los niveles más altos de pH y de la concentración de biotina, permiten obtener la mayor cantidad de isobutanol durante el proceso de fermentación. Específicamente esta condición se alcanza en niveles de pH cercanos a 6 y en concentraciones de biotina superiores a 50  $\mu\text{g/L}$ .

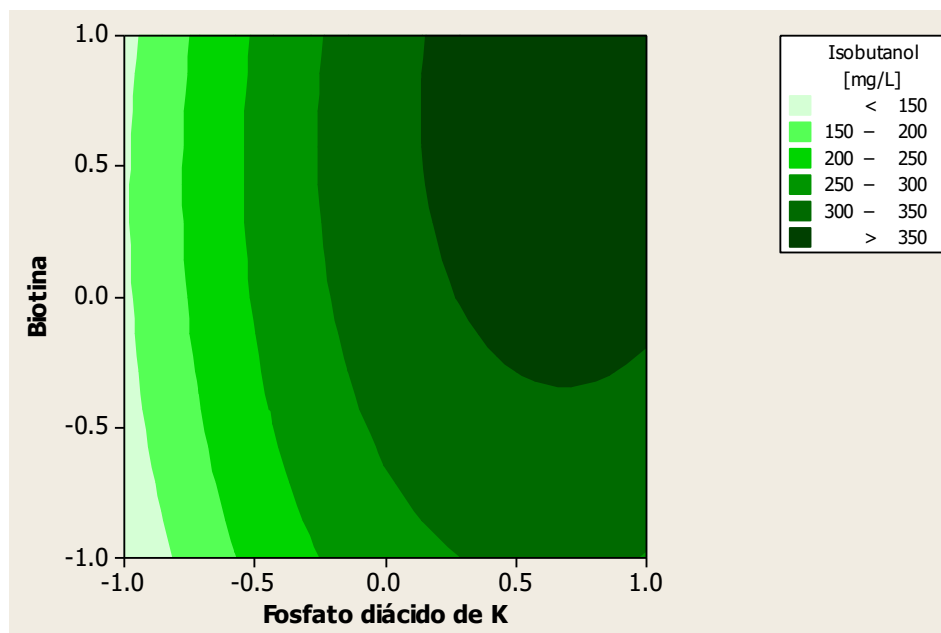
**Figura 3-3** Gráfica de contorno para la concentración de isobutanol como función del nivel del pH y de la concentración de biotina



**Figura 3-4** Gráfica de contorno para la concentración de isobutanol como función del nivel del pH y de la concentración de fosfato diácido de potasio



**Figura 3-5** Gráfica de contorno para la concentración de isobutanol como función de la concentración de fosfato diácido de potasio y de la concentración de biotina



La Figura 3-4 muestra que la concentración de fosfato diácido de potasio es el factor más crítico a tener en cuenta en la producción de isobutanol, en particular a una concentración mayor a 9 g/L de esta sustancia. Además, la forma de esta gráfica sugiere que aún puede requerirse una mayor experimentación con el fin de identificar los niveles de los factores que permitan optimizar la producción de isobutanol durante el proceso de fermentación. Por otro lado, la Figura 3-5 sugiere que la mayor producción de isobutanol se alcanza en los niveles más altos de la concentración del fosfato diácido de potasio, mientras la concentración de biotina más adecuada puede estar en el nivel de referencia.

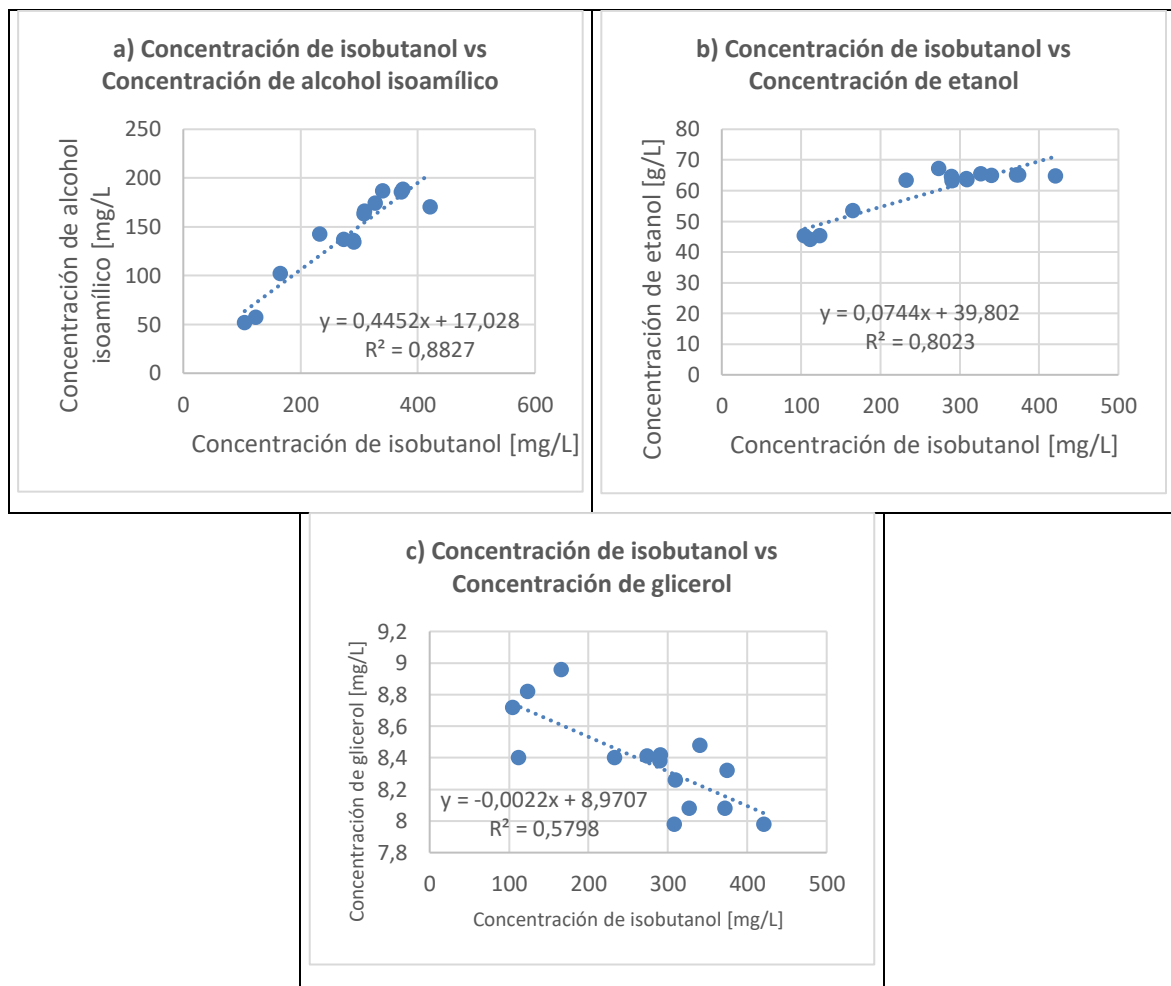
Realizando el análisis en conjunto de las gráficas de contorno se evidencia que la mayor producción se alcanzará cuando se ajuste el nivel de pH inicial a 6 (nivel alto para este factor), a la concentración de fosfato diácido de potasio de 9 g/L (nivel alto para este factor) y a una concentración de biotina de 50µg/L (nivel 0 para este factor). Teniendo en cuenta que el nivel de pH es un factor importante para estimular la producción de isobutanol, puede ser interesante controlarlo durante la fermentación con el fin de verificar si al mantener este parámetro en este nivel alto a lo largo del proceso también estimula la producción esta sustancia.

Por otra parte, al relacionar los niveles obtenidos para la producción de isobutanol con los niveles de producción de alcohol isoamílico, se observa que se mantiene un alto nivel de correlación (Ver Figura 3-6 a), lo cual corrobora que la biosíntesis de estos dos productos está altamente relacionada. Por otra parte, al relacionar los niveles obtenidos para la producción de isobutanol con los niveles de producción de etanol, se evidencia que hay un cambio respecto a la evaluación en el diseño Plackett-Burman, pues el nivel de correlación aumenta hasta 0.8023 (Ver Figura 3-6 b), mientras en el diseño previo fue de 0.1385 (Figura 3-2 c). Esto sugiere que bajo las condiciones evaluadas en el diseño Box-Behnken, que favorecen el proceso de producción de isobutanol, también favorecen la producción de etanol. Por otro lado, al relacionar la producción de isobutanol con la producción de glicerol, se observa que, a pesar de que se mantiene un nivel de correlación moderadamente alto, se reduce el grado de correlación, pues el coeficiente de determinación obtenido en este caso es de 0.5798 (Ver Figura 3-6 c), el cual es menor al

obtenido en la evaluación en el diseño Plackett-Burman, pues fue de 0.7115 (Ver Figura 3-2 a).

Adicionalmente, se resalta que, mediante la aplicación de este diseño experimental, se encuentra que la condición que permite alcanzar la concentración de isobutanol máxima fue de 421.3 mg/L, la cual es 1.3 veces más alta respecto a la condición evaluada en el punto central o de referencia, en la cual la concentración de isobutanol fue de 326.0 ±15.4 mg/L (el punto central se realiza por triplicado).

**Figura 3-6** Relación entre la producción de isobutanol y los otros productos de fermentación y el nivel de pH final



### 3.3 Conclusiones

Mediante el empleo del diseño experimental Plackett-Burman fue posible identificar que la suplementación de fosfato diácido de potasio y de biotina al medio de fermentación YNB, empleado como referencia, así como el nivel de pH de este medio, son las variables que tienen la mayor influencia en la producción de isobutanol durante la fermentación de glucosa. Se encontró que los factores que estimulan positivamente la producción de isobutanol también estimulan la producción de alcohol isoamílico, lo cual puede deberse a que las rutas metabólicas que conducen a su biosíntesis se encuentran bastante relacionadas.

A través del empleo del diseño experimental Box-Behnken, se identificaron los niveles de los factores fosfato diácido de potasio, biotina y pH utilizado que permiten alcanzar mayores niveles de isobutanol durante la fermentación de glucosa, en cual fue de 421.3 mg/L. Los niveles de estos factores podrían ser determinados y ajustados en medios industriales con el fin de que estos permitan una mayor producción de isobutanol.

## **4. Evaluación preliminar de los mutantes en biorreactor empleando mieles de caña como sustrato**

En esta fase del estudio se evaluaron dos cepas mutantes de la levadura *S. cerevisiae* para llevar a cabo el proceso de producción de isobutanol empleando mieles de caña de azúcar como sustrato. Las levaduras evaluadas fueron dos cepas mutantes previamente obtenidas. La cepa Q1 es resistente a sulfometuron metil (SM) y la cepa Q1m es una levadura derivada de la Q1 con auxotrofia para L-Leucina. El estudio se llevó a cabo en un biorreactor de 1.4 L de capacidad, con el fin de determinar la productividad y el rendimiento del proceso para la producción de etanol, cuando se emplean mieles de caña de azúcar y las cepas previamente mencionadas. Así mismo, se determinó el perfil de consumo de azúcares durante el proceso. La cepa Q1m, presentó los mejores resultados, mostrando que es necesario reducir la producción intracelular de L-leucina como siguiente etapa para el mejoramiento del microorganismo.

### **4.1 Materiales y métodos**

El sustrato seleccionado fue miel de caña proveniente de un trapiche ubicado en el Municipio de Puente Nacional Santander, este presentaba un contenido de sólidos solubles equivalente a 75 °Brix.

### **Microorganismos**

Dos cepas de la levadura *S. cerevisiae* fueron utilizadas en este estudio. La primera cepa fue la Q1, la cual fue obtenida mediante ensayos de mutagénesis y selección con SM, y que presentó una mayor producción de isobutanol que su cepa parental (209-2-8). La otra cepa es la Q1m, la cual fue obtenida a partir de procesos de mutagénesis realizados sobre la cepa Q1, con el fin de obtener una levadura mutante auxótrofa para L-leucina, que presentó una menor producción de alcohol isoamílico y una mayor cantidad de isobutanol.

### **Mantenimiento**

Las cepas fueron mantenidas bajo refrigeración a 4 °C en agar YPD (*Yeast extract, peptone, dextrose*) en el laboratorio 218, del edificio 412 de la Universidad Nacional de Colombia.

### **Medios de crecimiento**

El medio de crecimiento YPD se preparó con la siguiente composición: 20 g/L peptona, 10 g/L extracto de levadura, 20 g/L de glucosa y 20 g/L de agar-agar. El medio se esterilizó utilizando una autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El medio fue dosificado en cajas estériles bajo condiciones de asepsia y almacenado para su posterior uso.

El medio YMm (*Yeast Malt modified*) fue preparado con la siguiente composición: 50 g/L de glucosa, 5 g/L peptona, 3 g/L extracto de levadura, 3 g/L extracto de malta, 1 g/L de NH<sub>4</sub>Cl y 0.4 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El medio fue dosificado en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio. El medio se esterilizó utilizando una autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Los medios de crecimiento para la adaptación de las levaduras al medio de fermentación fueron preparados incluyendo miel de caña de azúcar como fuente de carbono. El medio MM1 (medio miel 1), contenía 80 g/L de miel de caña de azúcar, 2g/L de extracto de levadura y 1g/L de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El medio MM2 (medio miel 2), contenía 160 g/L de miel de caña de azúcar, 2g/L de extracto de levadura y 1g/L de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El medio MM3 (medio miel 1), contenía 80 g/L de miel de caña de azúcar, 2g/L de extracto de levadura, 2g/L de

peptona y 1g/L de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . El medio MM4 (medio miel 2), contenía 160 g/L de miel de caña de azúcar, 2g/L de extracto de levadura, 2g/L peptona y 1g/L de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . El medio es dosificado en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio. El medio se esterilizó en el biorreactor utilizando una autoclave a 121 °C durante 25 minutos.

### **Medios de fermentación**

El medio de fermentación contenía MF1: 200 g/L de miel de caña de azúcar, 2g/L de extracto de levadura y 0.5g/L de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . El medio de fermentación contenía MF2: 200 g/L de miel de caña de azúcar, 2g/L de extracto de levadura, 0.5g/L de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  y 0.4 g/L de L-leucina. Según el caso, 1.4 L de medio fueron dosificados en el biorreactor y se esterilizó utilizando una autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El pH de los medios una vez fueron esterilizados fue de 4.9.

### **Procedimiento para el desarrollo de inóculo**

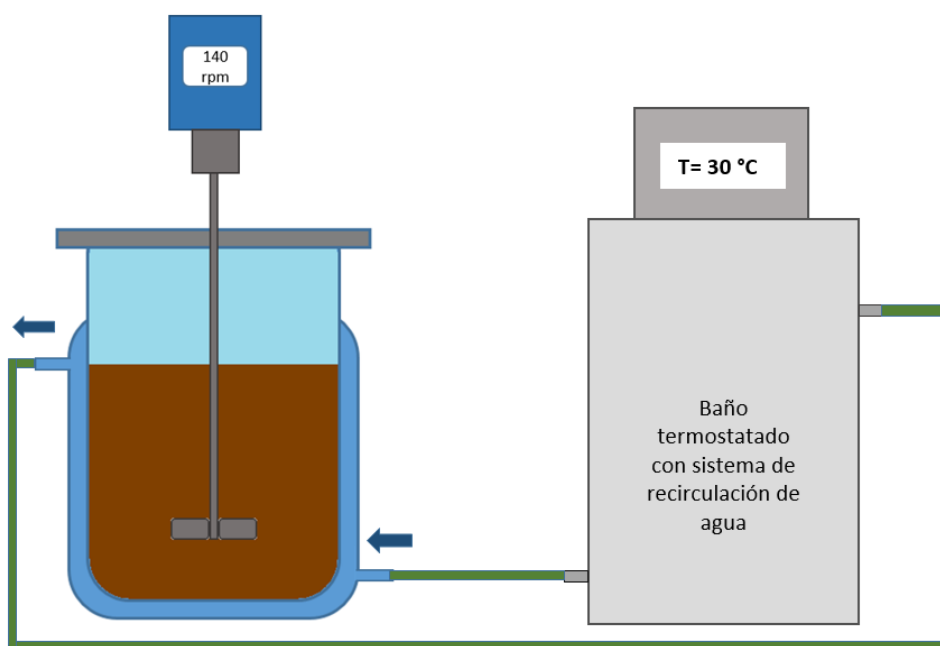
Para el desarrollo de inóculo, inicialmente las levaduras fueron cultivadas en el agar YPD por 48 horas a 30 °C. Posteriormente, una colonia fue transferida a medio líquido YMm, el crecimiento se permitió por 24 horas, este cultivo se realizó en 6 unidades distintas. Luego se realizó la primera fase de adaptación empleando la cepa Q1, para ello las células recuperadas de cada unidad crecida en medio YMm y fueron transferidas de manera aséptica a 6 unidades distintas que contenían medio MM1, el crecimiento se permitió por 16 horas. Finalmente, las células recuperadas de cada unidad crecida en medio MM1 y fueron transferidas de manera aséptica a 6 unidades distintas que contenían medio MM2, el crecimiento se permitió por 12 horas. Todas las fases de crecimiento en medio líquido se realizaron bajo condiciones de agitación a 150 rpm e incubación a 30 °C. Para la cepa Q1m, se utilizó el medio MM3 en lugar del medio MM1, y se utilizó el medio MM4 en lugar del medio MM2.

### **Procedimiento de la fermentación**

La biomasa celular recolectada desde cada una de las 6 unidades de crecimiento en el medio MM2 para la cepa Q1 o en el medio MM4 para la cepa Q1m, fue combinada y

resuspendida en medio de fermentación, MF1 para la cepa Q1 y MF2 para la cepa Q2. Un volumen de 28 mL de la suspensión fue empleado como inóculo para el biorreactor. El sistema de fermentación incluía un baño termostataado que mantenía la temperatura a 30 °C, además tenía un motor para agitación mecánica que fue ajustado a 140 rpm. El sistema de fermentación empleado es mostrado en la Figura 4-1.

**Figura 4-1** Esquema del sistema de fermentación utilizado para la evaluación en biorreactor



Para el seguimiento del proceso de fermentación se tomaron muestras de aproximadamente 10 mL de suspensión celular, a las 0, 6, 12, 24, 30, 36 y 48 horas, momento en el cual se dio por finalizada la fermentación.

### **Determinaciones analíticas**

Una vez fueron tomadas las muestras se procesaron para la determinación de pH, peso seco, contenido de azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa) y contenido de alcoholes (isobutanol, etanol, glicerol y alcohol isoamílico). Para la determinación de peso seco se

tomaron 10 mL de muestra, las células fueron colectadas por centrifugación a 8500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados con agua destilada y fueron secadas por un periodo de 48 horas a 60 °C.

El contenido de glucosa, fructosa y sacarosa fue determinado mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en un cromatógrafo de líquidos de Hitachi® modelo Elite LaChrom, equipado con un detector de índice de refracción. Se empleó la columna SC1011 de Shodex para la separación, la cual fue mantenida a 80 °C. Como fase móvil se empleó agua desionizada, microfiltrada y desgasificada con un flujo de 0.8 mL/min. La temperatura del detector se ajustó a 40 °C. Se emplearon 20 microlitros como volumen de inyección. Se realizaron diluciones apropiadas para la cuantificación.

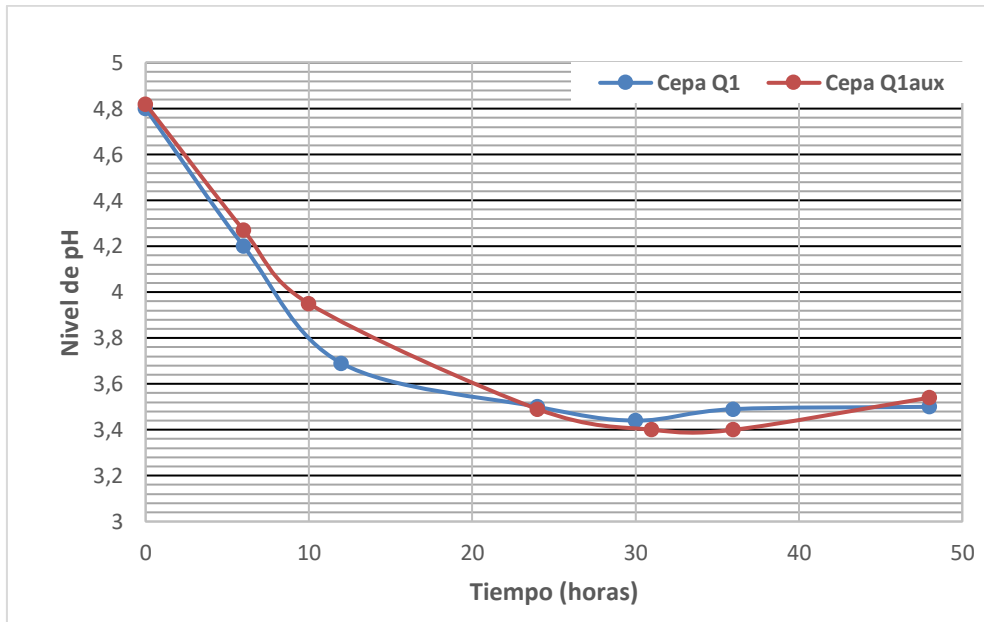
Para la determinación del contenido de alcoholes se utilizó el mismo equipo de cromatografía, pero se empleó la columna Aminex HPX-87H BioRad®. Como fase móvil se empleó una solución acuosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM, con un flujo de 0.6 mL/min. La temperatura del detector se ajustó a 40 °C. Se emplearon 20 microlitros como volumen de inyección.

## 4.2 Resultados y discusión

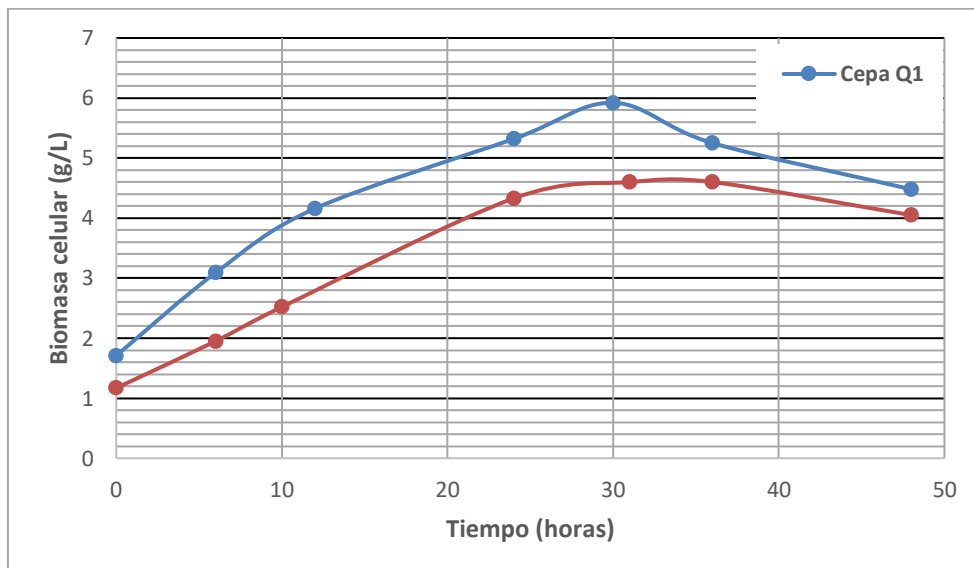
### **Comparación del comportamiento del pH de las cepas mutantes**

A realizar la fermentación utilizando las dos cepas mutantes Q1 y Q1m, y realizar el seguimiento del nivel de pH durante proceso de fermentación de los azúcares contenidos en la miel, se obtienen los resultados mostrados en la Figura 4-2.

De acuerdo con lo observado en la Figura 4-2, se evidencia que el pH mantiene una tendencia decreciente, desde el valor inicial de 4.9 hasta un pH cercano a 3.5 durante las primeras 24 horas de la fermentación. Este descenso de pH puede ser producido por la producción de ácidos orgánicos durante el proceso de fermentación [134].

**Figura 4-2** Perfil de cambio de pH con el tiempo durante la fermentación

### Comparación de la producción de biomasa celular durante la fermentación

**Figura 4-3** Producción de biomasa de las levaduras mutantes durante la fermentación

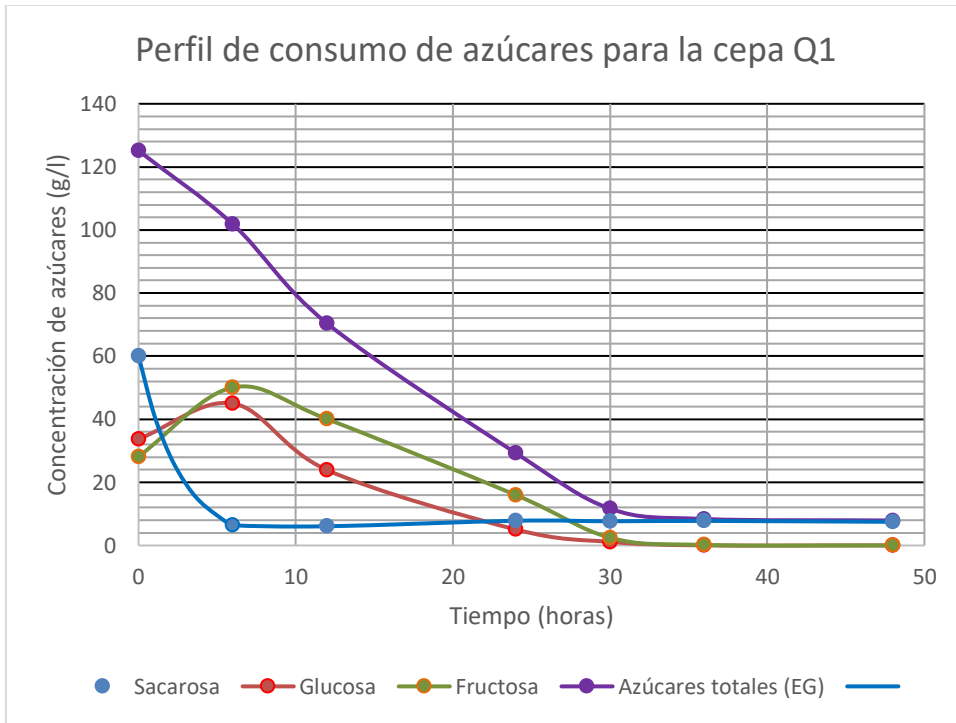
Como parámetro para medir el crecimiento celular se tomó el peso seco. Los resultados son mostrados en la Figura 4-3. Se observa que a pesar de que la concentración celular

inicial es diferente, el crecimiento para ambas cepas cesa alrededor de las 30 horas. No se aprecia una etapa de adaptación lo cual puede ser debido a que las células fueron previamente cultivadas en medio que tenía miel como fuente de carbono, y, por lo tanto, las levaduras presentaban una adaptación desde la etapa de crecimiento previa. La Figura 4-3 también muestra que para ambas cepas luego de un periodo de 30 horas se observa un descenso en el peso seco, lo cual puede ser debido a procesos de lisis celular causados por las altas concentraciones de alcohol, o también puede ser debido a la asimilación de fuentes de reserva intracelulares, que indicarían que a pesar de que el número de células viables se mantenga, es posible que la masa individual de cada célula se reduzca por el consumo de estas fuentes de reserva. Sin embargo, para validar esta información, se requiere de la implementación de otras mediciones. Al relacionar la concentración de biomasa a 30 horas con la concentración de biomasa inicial, se tiene que la cepa Q1 presentó un incremento de biomasa de 3.4 veces, mientras la cepa Q1m presentó un incremento de 3.9 veces. Sin embargo, estos resultados aún son preliminares y más réplicas deben ser realizadas con el fin sacar conclusiones correctas acerca de este comportamiento.

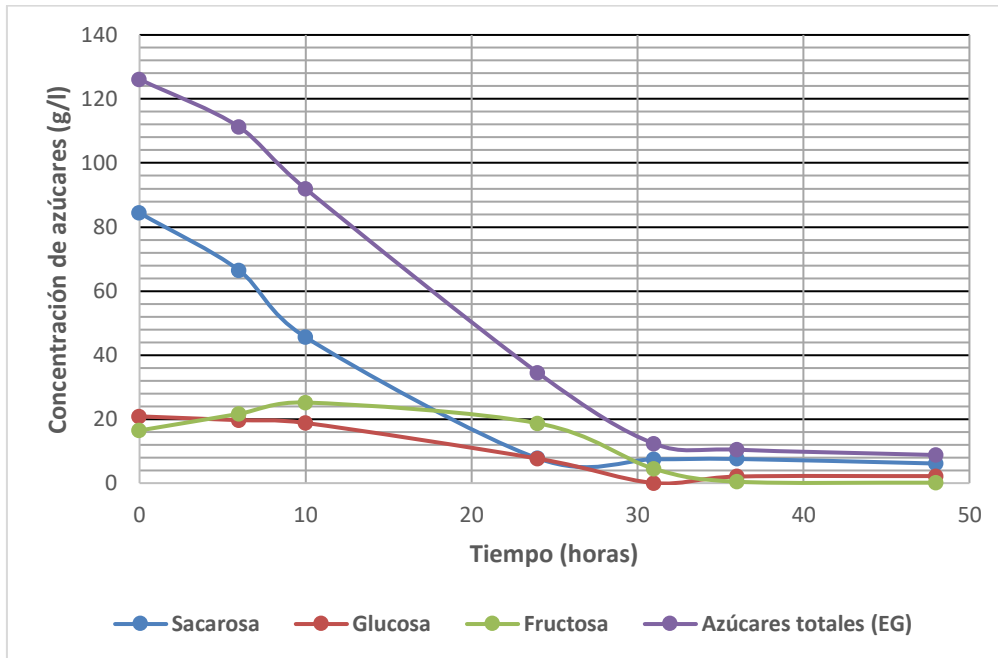
#### **Perfil de consumo de azúcares de los mutantes durante la fermentación**

Los perfiles de consumo de los azúcares presentes en las mieles de caña durante la fermentación son mostrados en las Figuras 4-4 y 4-5, para las cepas Q1 y Q1m, respectivamente. Se cuantificaron los contenidos de sacarosa, glucosa y fructosa. Se observa en la Figura 4-4 que en las primeras horas del proceso la cepa Q1 hidroliza prácticamente toda la sacarosa presente en la miel, mientras la cepa Q1m (ver Figura 4-5) presenta una menor actividad invertasa, causando que la hidrólisis de la sacarosa presente en el medio se lleve a cabo en 24 horas. Este alto nivel de hidrólisis observado para la cepa Q1 puede explicar el incremento del contenido de glucosa y fructosa presentes en el medio a las 6 horas. Esto contrasta con el comportamiento observado para la cepa Q1m, en donde se observa que no hay incremento del nivel de glucosa o fructosa.

**Figura 4-4** Perfil de consumo de azúcares durante la fermentación por la cepa Q1



**Figura 4-5** Perfil de consumo de azúcares durante la fermentación por la cepa Q1m

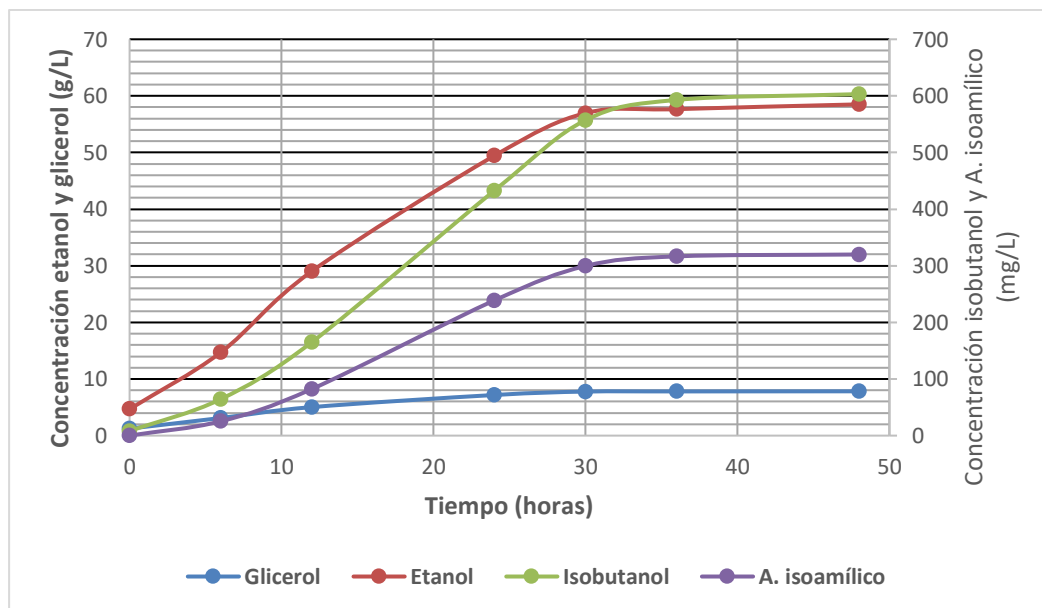


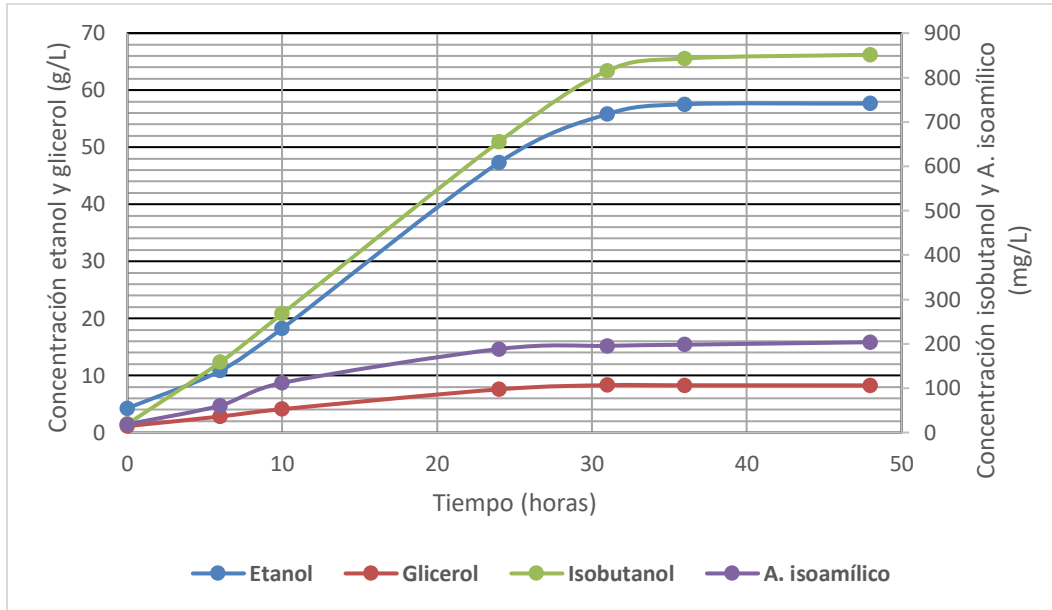
Con el fin de obtener un perfil de consumo global de los azúcares se determinó el parámetro azúcares totales expresados como glucosa (EG), mostrados en las Figuras 4-4 y 4-5. Este parámetro se estimó teniendo en cuenta que la sacarosa al hidrolizarse produce una unidad de glucosa y fructosa, y además teniendo en cuenta que una molécula de fructosa es equivalente a una molécula de glucosa en términos de la producción de etanol. Como se observa en las Figuras 4-4 y 4-5, este parámetro es consistente con el perfil de crecimiento observado en las Figura 4-3, esto teniendo en cuenta que no se evidencia consumo de sustrato luego de la hora 30, así como ya no se observa crecimiento.

### **Producción de alcoholes durante la fermentación**

La producción de alcoholes durante el tiempo de la fermentación por parte de las cepas mutantes es presentada en la Figura 4-6 para la cepa Q1 y en la Figura 4-7 para la cepa Q1m. Al observar las Figuras 4-6 y 4-7, es evidente que la producción de los diferentes alcoholes cesa prácticamente luego de 30 horas de fermentación. Este comportamiento es consistente con el analizado para el crecimiento celular y para el consumo de azúcares.

**Figura 4-6** Producción de alcoholes durante la fermentación por la cepa Q1



**Figura 4-7** Producción de alcoholes durante la fermentación por la cepa Q1m

La producción de etanol por parte de la cepa Q1 alcanzó una concentración máxima de 58.5 g/L (7.4 %v/v) de etanol, mientras la cepa Q1m alcanzó una producción máxima de 57.7g/L (7.3 % v/v), esto muestra que las mutaciones que la cepa Q1ux presenta, no afectan fuertemente la capacidad de producir etanol de la cepa. En cuanto a la producción de glicerol es importante notar que la cepa Q1m presenta una mayor producción de glicerol respecto a la cepa Q1 (8.3 g/L y 7.8 g/L respectivamente). Estos datos son consistentes con el decremento en la producción de etanol por parte de la cepa Q1.

La producción de isobutanol y de alcohol isoamílico es sustancialmente diferente en las dos cepas estudiadas. La máxima concentración de isobutanol para la cepa Q1 fue de 603.1 mg/L, mientras para la cepa Q1m fue de 851.4 mg/l, es decir la producción de esta sustancia por la cepa Q1m fue 1.4 veces mayor a la obtenida con la cepa Q1. Estos resultados están de acuerdo con lo esperado, teniendo en cuenta que la cepa Q1m presenta auxotrofia para el aminoácido L-leucina. Esto implica que esta característica nutricional causa un mayor alivio de la regulación por retroalimentación que ejerce la L-leucina sobre la biosíntesis de aminoácidos ramificados y por lo tanto conduciendo a una mayor cantidad de isobutanol producida. Teniendo en cuenta que la auxotrofia para L-leucina causa que la levadura no pueda crecer a menos que esta sustancia sea

suministrada exógenamente, y además considerando que la producción de alcohol isoamílico está relacionada con la producción de L-leucina, se evidencia que la cepa Q1m presenta una producción 1.6 veces menor de alcohol isoamílico que la cepa Q1, siendo la concentración de alcohol de 203.6 mg/L y 319.9 mg/L, respectivamente para las cepas mencionadas.

Estos resultados son muy interesantes porque muestran que la proporción de isobutanol a alcohol isoamílico, los cuales son los componentes mayoritarios de los alcoholes fusel, ha sido totalmente invertida durante los procesos de mutagénesis que permitieron obtener las cepas mutantes, pues se ha reportado que para plantas comerciales dedicadas a la producción de etanol en Colombia, el alcohol isoamílico es el componente mayoritario con un máximo de 80.74 % en peso de la mezcla de alcoholes fusel, mientras la concentración del isobutanol, alcanza a un máximo de 7.28 [48]. Para plantas comerciales de producción de etanol que emplean melazas de caña de azúcar como sustrato se ha reportado que la producción de alcoholes fusel puede ser de hasta máximo 11 L por cada 1000 L de etanol producido [47]. En este caso considerando la mezcla de alcoholes fusel para la cepa Q1m únicamente como compuesta por alcohol isoamílico e isobutanol, se tendría un equivalente cercano a 18 L de fusel por cada 1000 L de etanol producido, implicando que las cepas mutantes presentan una mayor capacidad de producir estas sustancias.

### **Evaluación de rendimiento y productividad**

Los rendimientos máximos teóricos para la producción de etanol e isobutanol a partir de glucosa durante un proceso de fermentación son 0.51 g de etanol/ g glucosa y 0.41 g de isobutanol/ g de glucosa. Los resultados mostrados en la Tabla 4-1, muestran los rendimientos calculados para algunos de los productos de fermentación, así como también se reportan las productividades. Chen y col. [14] realizando múltiples modificaciones genéticas en una cepa de la especie *S. cerevisiae*, entre las que se incluye la sobreexpresión de varios genes relacionados con la biosíntesis de L-valina y del gen de la aminotransferasa de aminoácidos ramificados citosólica (*BAT2*) han mostrado que el rendimiento obtenido es de 0.97 mg de isobutanol/ gramo de glucosa, mientras en el trabajo de Ofuonye y col. [61], que cuenta con un número mayor de modificaciones genéticas sobre una cepa de *S. cerevisiae*, entre las que además de sobreexpresar genes

asociados a la biosíntesis de L-valina, también se introdujeron algunos genes heterólogos como el *kdcA* (cetoácido descarboxilasa de *L. lactis*) y *yqhD* (alcohol deshidrogenasa de *E. coli*), realizaron la sobreexpresión de una enzima NADH quinasa mitocondrial (*POS5*) la delección del gen *PDC1* y muestran un rendimiento de 7.8 mg de isobutanol/g de glucosa consumida. En la más reciente publicación Wess y col. [51], obtuvieron un rendimiento de 59.55 mg de isobutanol/g de glucosa, con modificaciones que incluyeron trasladar la expresión de los genes asociados a la biosíntesis de L-valina desde la mitocondria al citosol para compartimentalizar la producción de esta sustancia, además redujeron la producción de glicerol y de etanol a través de la delección de los genes *ADH1*, *GPD1*, *GPD2* y *ALD6*. Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio con la cepa Q1m para el rendimiento en producción de isobutanol a partir de glucosa iguales a 7.09 mg/g muestran que la cepa mutante tiene un relativamente alto rendimiento, para una cepa que solo cuenta con dos etapas de mejoramiento por procedimientos aleatorios.

Respecto a la evaluación de la productividad es importante resaltar que el valor obtenido de este parámetro para las fermentaciones realizadas con las cepas mutantes estuvo entre 18,30 y 26.30 mg/L\*h (ver Tabla 4-1) para la Q1 y Q1m, respectivamente. Estos valores son más altos a los reportados por Ofuonye y col. [61] de 8 mg/L\*h de isobutanol, y cercanos a los reportados por Wess y col. [51] de 21.7 mg/L\*h, y por Hammer y Avalos [11] de 26.04 mg/L\*h, indicando que los procedimientos de mutagénesis realizados permitieron mejorar la velocidad en la producción de isobutanol. De manera adicional se puede corroborar que el desempeño de la fermentación en general fue bueno para las cepas empleadas considerando que la productividad obtenida estuvo entre 1.66 y 1.74 g/L\*h, valores que son cercanos a los obtenidos por Laopaiboon y col. [135] en jugo de sorgo (1,67 g etanol/L\*h) y a los obtenidos por Fernández-López y col. [136] (3,8 g etanol/L\*h) en mieles B de caña de azúcar. Estos resultados sugieren que el procedimiento de mutagénesis no afectó negativamente el desempeño en el proceso de fermentación realizado por parte de las levaduras. Finalmente es importante tener en cuenta que la comparación realizada tuvo en cuenta únicamente la productividad obtenida a 30 horas y no a 48 horas, ya que para esa hora de proceso ya se presentaba la menor concentración de azúcares y la mayor producción de biomasa, mientras la concentración de isobutanol fue cercana a la máxima obtenida.

**Tabla 4-1** Rendimientos y productividades para las cepas mutantes durante la fermentación

Parámetro	Cepa Q1	Cepa Q1m
Rendimiento sustrato a isobutanol $Y_{P_1/S}$ (mg isobutanol/g de azúcares GE)	5,08	7,09
Rendimiento sustrato a etanol $Y_{P_2/S}$ (g etanol/g de azúcares GE)	0,46	0,45
Rendimiento sustrato a biomasa $Y_{X/S}$ (g biomasa seca/g de azúcares GE)	0,0236	0,0245
Productividad volumétrica a 30 horas isobutanol (mg/L*h)	18,30	26,30
Productividad volumétrica a 48 horas isobutanol (g/L*h)	12,40	17,34
Productividad volumétrica a 30 horas etanol (g/L*h)	1,74	1,66
Productividad volumétrica a 48 horas etanol (g/L*h)	1,12	1,11

### 4.3 Conclusión

Los parámetros de fermentación determinados para las dos cepas mutantes en relación con la producción de isobutanol mostraron valores relativamente altos respecto a los niveles que han sido reportados. Estos valores aún son bajos para un proceso dedicado exclusivamente para la producción de isobutanol. Sin embargo, considerando que este proceso está acoplado a la producción de etanol mediante la fermentación alcohólica convencional, esto permitiría una producción comercial a corto plazo, en el que el aceite de fusel se produce en mayor cantidad y con una mayor proporción de isobutanol.



## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

Con la realización del estudio fue posible determinar el potencial que tienen las cepas nativas de *S. cerevisiae* para la producción de isobutanol cuando se emplean mieles de caña de azúcar como medio de fermentación. Así mismo, fue posible demostrar que a través de procesos de mutagénesis química es posible incrementar la producción de alcoholes fusel como el isobutanol y el alcohol isoamílico para la cepa 209-2-8 de *S. cerevisiae*, además, se comprobó que el empleo de sulfometuron metil como inhibidor de la biosíntesis de L-valina facilita la identificación de mutantes con mayor producción de isobutanol en los procesos de mutagénesis. De igual manera fue posible verificar que la cepa auxótrofa para L-leucina obtenida por mutagénesis y selección con nistatina, presentó una mayor producción de isobutanol y redujo la producción de alcohol isoamílico, posiblemente debido a un mayor flujo de carbono de 2-cetoisovalerato hacia isobutanol y no hacia el intermediario 2-isopropilmalato, el cual es clave para la biosíntesis de L-leucina y por lo tanto de alcohol isoamílico.

Mediante el uso de los diseños experimentales Plackett-Burman y Box-Behnken fue posible identificar que los factores más importantes que influyen la producción de isobutanol son la concentración de fosfato diácido de potasio, la concentración de biotina y el nivel de pH del medio, así como también fue posible establecer los niveles de estos factores que permiten obtener una mayor cantidad de isobutanol en un medio químicamente definido. Estos factores pueden ser empleados en nuevos estudios en los que busque mejorar la producción de isobutanol en procesos de fermentación cuando se empleen medios industriales.

La evaluación preliminar de los parámetros de fermentación determinados a través de realización de ensayos llevados a cabo a escala biorreactor para la cepa *S. cerevisiae* Q1, permiten sugerir que la cepa podría ser empleada en un proceso de producción a escala comercial en el que el principal producto sea etanol, y como subproducto del proceso se obtendría aceite fusel en mayor cantidad y más enriquecido en isobutanol. Para realizar un proceso en el que el producto principal sea isobutanol se deben realizar mayores transformaciones en la cepa Q1, para que esta minimice su producción de etanol y de glicerol, entre otras modificaciones genéticas.





## 5.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar una caracterización genómica completa de la cepa de *S. cerevisiae* 209-2-8, obtenida durante el desarrollo de este trabajo. Esto permitirá corroborar el carácter *petite* de la cepa, y, por lo tanto, permitirá establecer si la mutación o mutaciones que presenta respecto a la cepa parental *S. cerevisiae* 209-2, permiten alcanzar mayores concentraciones de isobutanol durante el proceso de fermentación. En este sentido, también es conveniente determinar el nivel de ploidía que presenta la cepa, considerando que este es un factor determinante para el éxito de futuras transformaciones que se puedan realizar sobre este microorganismo.

Además, se recomienda realizar una caracterización genómica completa de la cepa de *S. cerevisiae* Q1, obtenida durante el desarrollo de este trabajo. Esto permitirá identificar la mutación o las mutaciones que presenta respecto a la cepa parental *S. cerevisiae* 209-2-8, las cuales generan el fenotipo de resistencia sulfometuron metil y que además permiten alcanzar mayores concentraciones de isobutanol y alcohol isoamílico durante el proceso de fermentación.

Se recomienda la implementación de metodologías que permitan la obtención de células haploides, de manera que se puedan implementar nuevos procesos de mutagénesis, en los que se puedan identificar mutantes que dependan de mutaciones recesivas.

Considerando que la cepa *S. cerevisiae* Q1 presenta una leve disminución en la producción de etanol respecto a las cepas identificadas como mayor productoras de esta sustancia, y teniendo en cuenta que la producción de isobutanol y alcohol isoamílico por esta cepa es mayor a los reportes encontrados sobre la producción de estas sustancias, se recomienda realizar un estudio del proceso de fermentación a mayor escala, esto permitirá determinar si la levadura mantiene esta producción, bajo las condiciones de estrés a las que las levaduras usadas industrialmente son sometidas. De mantenerse esta producción, será posible obtener en el proceso industrial una corriente de proceso con un mayor flujo de alcoholes fusel y además enriquecida con isobutanol como principal componente.

---

Con el fin de mejorar la selectividad del proceso favoreciendo una mayor producción de isobutanol, se recomienda atenuar la expresión de algunos de los genes involucrados con la biosíntesis de L-leucina, ya que como se demostró con la realización del presente estudio, la eliminación de la biosíntesis de esta sustancia permite una mayor producción de isobutanol y además trae como consecuencia la reducción de la producción de alcohol isoamílico.

Con el fin de obtener una cepa de *S. cerevisiae* en la que el isobutanol pueda ser el principal producto de la fermentación, se recomienda eliminar la producción de las enzimas piruvato descarboxilasas que presenta la levadura y realizar una sustitución por enzimas presentes en otros organismos que presenten una menor afinidad hacia piruvato pero si hacía  $\alpha$ -cetoácidos de mayor peso molecular, esto permitirá reducir el flujo de carbono hacia etanol y favorecer la producción de isobutanol, esto con la respectiva sobreexpresión de los genes asociados a la producción de L-valina. Asimismo, se recomienda la realización de un análisis de flujos metabólicos que permita identificar los pasos limitantes en la biosíntesis de isobutanol y así de esta manera establecer nuevos blancos para el mejoramiento genético de las cepas.

Puesto que se identificó que el nivel de pH, la concentración de fosfato diácido de potasio y la concentración de biotina, son los factores que presentan mayor influencia en la producción de isobutanol en un medio químicamente definido, se recomienda que la concentración de las dos sustancias sea determinada en medios industriales, con el fin de verificar que estén presentes en los niveles que permitan una mayor producción de isobutanol o si requieren de un ajuste. También, se recomienda ajustar el nivel de pH del medio al nivel encontrado como más adecuado para la producción de esta sustancia. Esto además permitirá validar si el ajuste de estos tres factores es suficiente para mejorar la producción de isobutanol en medios industriales.

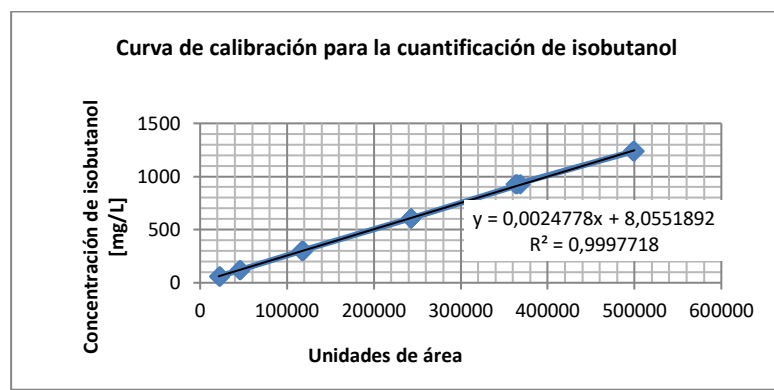
Considerando como punto de partida el medio químicamente definido en el que se alcanzó la mayor producción de isobutanol, se recomienda realizar una nueva fase de exploración de factores que influyen la producción de esta sustancia. Esta exploración se sugiere se realice empleando los niveles de estos factores más bajos a los presentados en el medio YNB. Esto considerando que los requerimientos de estos nutrientes pueden ser diferentes

tomando este nuevo punto de partida y que aún pueden ajustarse a un nivel más adecuado para alcanzar una mayor producción de isobutanol.

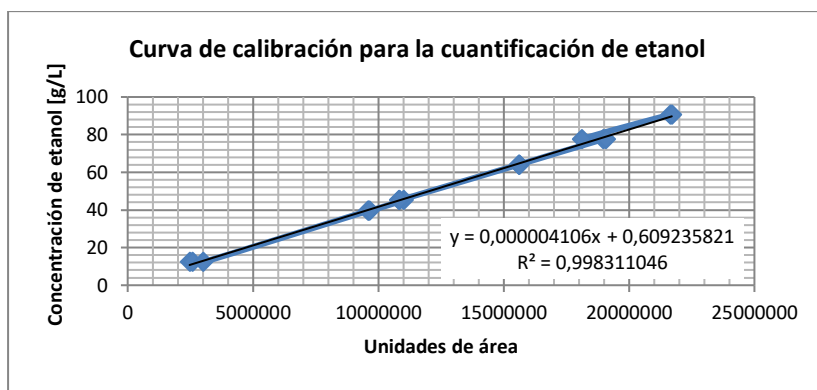


## A. Anexo: Modelo de curvas de calibración para la cuantificación por HPLC

Modelo de curva de calibración obtenida para determinar la concentración de isobutanol



Modelo de curva de calibración obtenida para determinar la concentración de etanol



Modelo de ecuación utilizada para la determinación de glicerol:

$$[\text{glicerol en g/L}] = 3.8653 \cdot 10^{-5} \cdot \text{Altura de pico} - 0.02722$$

Modelo de ecuación utilizada para la determinación de alcohol isoamílico

$$[\text{alcohol isoamílico en g/L}] = 1.4035 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Altura de pico} + 5.623 \cdot 10^{-5}$$



## **B. Anexo: Información complementaria del capítulo 2**

### **Método utilizado para la determinación del contenido de amino nitrógeno libre**

El método empleado es AOAC 945.30. Malt beverages and brewing materiales. Chapter 27. Pg. 39. (27-7-01) [137].

#### **Reactivos y soluciones de trabajo**

a) Reactivo de color (ninhidrina): Disolver 10.0 gramos de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 6.0g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5g 1,2,3 –indantriona\* $\text{H}_2\text{O}$  y 0.3g de fructosa en agua y diluir a 100 mL. El pH debe estar entre 6.6-6.8. El reactivo es estable por 2 semanas si se mantiene en una botella ámbar con refrigeración.

b) Solución para dilución: Disolver 2g de  $\text{KIO}_3$  en 600 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y 400 mL de alcohol al 96%. Almacenar a 5°C.

c) Stock de estándar de glicina: Disolver 107.2 mg de glicina (peso molecular: 75.07 g/mol) en 100 mL de agua. Teniendo en cuenta que el contenido de nitrógeno es de un átomo por cada molécula de glicina, se tiene que los 107.2mg aportan 20 mg de nitrógeno a la solución preparada. De esta manera queda formada una solución con 200mg/L de N.

d) Solución de trabajo: 2 mg amino N/L. Diluir 1.0 mL del stock a 100 mL con agua.

#### **Realización del ensayo**

Preparación de la muestra. Remover  $\text{CO}_2$  por transferencia de la muestra a un frasco grande y agitación, primero gentilmente y luego vigorosamente, manteniendo la temperatura de la cerveza entre 20-25 °C. Si es necesario remover material suspendido pasar la muestra libre de  $\text{CO}_2$  a través de papel filtro seco. (Official Method 920.49).

Preparar la muestra para análisis diluyendo 1.0 mL de la muestra a 50 mL con agua (otras diluciones pueden ser requeridas para obtener 1-3 mg amino nitrógeno libre en la solución diluida). Transferir 2mL de cada tubo de ensayo para análisis (16\*150 mm) y proceder.

Transferir 2.0 mL de solución de trabajo de glicina a cada uno de los 3 tubos de ensayo. Para el blanco, se debe transferir 2.0 mL de agua a cada uno de los tres tubos.

Reacción: Adicionar 1.0 mL del reactivo de ninhidrina a cada tubo. Disponer los tubos en una gradilla y taparlos con esferas de vidrio de 15 a 20 milímetros para reducir la evaporación.

Calentar exactamente en un baño de agua a ebullición por 16 minutos. Enfriar 20 minutos en un baño a 20°C y adicionar 5 mL de solución de dilución. Mezclar y determinar la absorbancia a 570 nm contra agua luego de 30 minutos.

Cálculos:

$$FAN \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{\text{Absorbancia neta de la solución con la muestra} * 2 * \text{dilución}}{\text{Absorbancia de la solución estandar neta}}$$


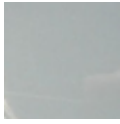

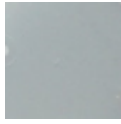

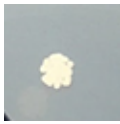

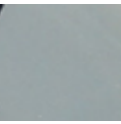

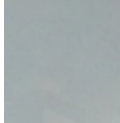


#### Análisis Amino Nitrógeno Libre para mieles

Ensayo	Resultado (mg/L)
Ensayo 1	72.7
Ensayo 2	68.6
Ensayo 3	66.7
Ensayo 4	62.5







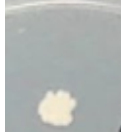
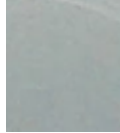










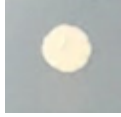

Principio del método

La ninhidrina es un agente oxidante y causa de la descarboxilación oxidativa de alfa aminoácidos, produciendo dióxido de carbono y amoniaco y un aldehído con un átomo de carbono menos que el aminoácido del original. La ninhidrina reducida reacciona con la no reducida y con el amoniaco liberado, formando un complejo azul. La fructosa es incluida en los reactivos como un agente reductor. Yodato de potasio en la solución mantiene la ninhidrina oxidada, asegurando que no haya mayor desarrollo de color [138].

**Comparación del crecimiento de diversas cepas de *S. cerevisiae* en medio con SM**

Cepa	YNB + SA+2 % agar	YNB + 2 % agar + 100µg/mL de SM	Cepa	YNB + SA+2 % agar	YNB + 2 % agar + 100µg/mL de SM
<i>S. cerevisiae</i> 209-2-8			<i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red®		
<i>S. cerevisiae</i> Q1			<i>S. cerevisiae</i> 202-3		
<i>S. cerevisiae</i> 209-2			<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763		

**Caracterización del crecimiento de la cepa mutante *S. cerevisiae* Q1 en fuentes de carbono fermentables**

Cepa	YNB + SA+2 % agar Glucosa	YNB + SA+2 % agar Sacarosa	YNB + SA+2 % agar Fructosa	YNB + SA+2 % agar Galactosa
<i>S. cerevisiae</i> 209-2-8				
<i>S. cerevisiae</i> Q1				
<i>S. cerevisiae</i> 209-2				
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763				
<i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red®				

**Análisis de varianza para determinar si el factor de cepa es significativo en la producción de etanol**

Análisis de varianza para la concentración de etanol				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
107-4	3	155.43	51.81	5.8923
109-5	3	153	51	132.28
109-8	3	180.5	60.1666667	13.6008333
109-9	3	165.18	55.06	7.7068
109-11	3	171.82	57.2733333	34.0005333
112-4	3	189.71	63.2366667	25.4720333
119-1	3	203.97	67.99	45.4363
119-3	3	211.3	70.4333333	22.2533333
120-6	3	201.384	67.128	2.103952
120-8	3	204.53	68.1766667	4.9796333
202-3	3	218.5	72.8333333	9.4033333
204-2	3	174.305	58.1016667	2.55200833

206-9	3	199.1	66.3666667	2.33333333
207-3	3	189.89	63.2966667	12.7690333
209-2	3	212.9	70.9666667	6.44333333
212-1	3	216.27	72.09	14.5483
213-6	3	175.58	58.5266667	14.2101333
213-8	3	170.33	56.7766667	9.97963333
214-2	3	202.9	67.6333333	21.8233333
215-5	3	179.89	59.9633333	2.41903333

## ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2594.09604	19	136.531371	6.99789101	1.31E-07	1.85289183
Dentro de los grupos	780.414387	40	19.5103597			
Total	3374.51043	59				

**Análisis de varianza para determinar si el factor de cepa es significativo en la producción de isobutanol**

<i>Análisis de varianza para la concentración de isobutanol</i>				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
107-4	3	119.07	39.69	26.2371
109-5	3	85.8	28.6	132.37
109-8	3	99.42	33.14	3.3628
109-9	3	78.25	26.0833333	12.7608333
109-11	3	91.21	30.4033333	0.81003333
112-4	3	94.8	31.6	5.25
119-1	3	64.95	21.65	4.0525
119-3	3	67.6	22.5333333	15.6233333
120-6	3	95.8	31.9333333	43.8433333
120-8	3	62.73	20.91	7.2583
202-3	3	96.76	32.2533333	14.0065333
204-2	3	121	40.3333333	7.54333333
206-9	3	64.37	21.4566667	0.94843333
207-3	3	78.604	26.2013333	4.95840533
209-2	3	79.73	26.5766667	13.7806333
212-1	3	92.36	30.7866667	6.97653333
213-6	3	104.5	34.8333333	26.5233333
213-8	3	107.74	35.9133333	4.06653333
214-2	3	68.57	22.8566667	10.4466333

215-5	3	62.22	20.74	1.3648
-------	---	-------	-------	--------

## ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2157.6281	19	113.559374	6.63733962	2.6627E-07	1.85289183
Dentro de los grupos	684.366811	40	17.1091703			
Total	2841.99491	59				

**Protocolo utilizado para la extracción de ADN genómico**

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo por la metodología propuesta por Maqueda [139]. Se describe a continuación:

1. Las levaduras son inoculadas en 5 ml de medio líquido (YPD) e incubadas toda la noche a 28-30 °C con agitación orbital a 160 rpm.
2. Centrifugar el cultivo a 8500 rpm por 5 min.
3. Descartar sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de 50 mM Na<sub>2</sub>EDTA (pH 7.5), aplicar vortex y transferir a tubos de centrifuga de 2 ml.
4. Centrifugar a 10000 rpm por 5 min.
5. Retirar sobrenadante todo con pipeta y resuspender en 1 ml de 50 mM de Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/1% 2 mercaptoetanol por 15 min a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 5000 rpm por 10 min, se toma la fase acuosa.
7. Descartar sobrenadante y resuspender en 1 ml de 0,1 M NaCl/10mM Tris HCl (pH 7,5)/10 mM Na<sub>2</sub>EDTA/0,2 % SDS, agregar 0,7 ml de fenol (pH 8.0) e incubar la muestra a temperatura ambiente 30 min con agitación.
8. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min, se toma la fase acuosa.
9. La fase acuosa contiene los ácidos nucleicos (p. e.: 700 µl). Se adiciona 1/10 del volumen (p. e.: 70 µl) de Acetato de Potasio 3 M frío (10 min)
10. Se precipitan los ácidos nucleicos con 1 ml de isopropanol frío.
11. Incubar a temperatura ambiente por 5 min y centrifugar a 13000 rpm durante 10 min.
12. El precipitado se lava con 1 ml de etanol al 70 % , centrifugar a 13000 rpm 10 min.

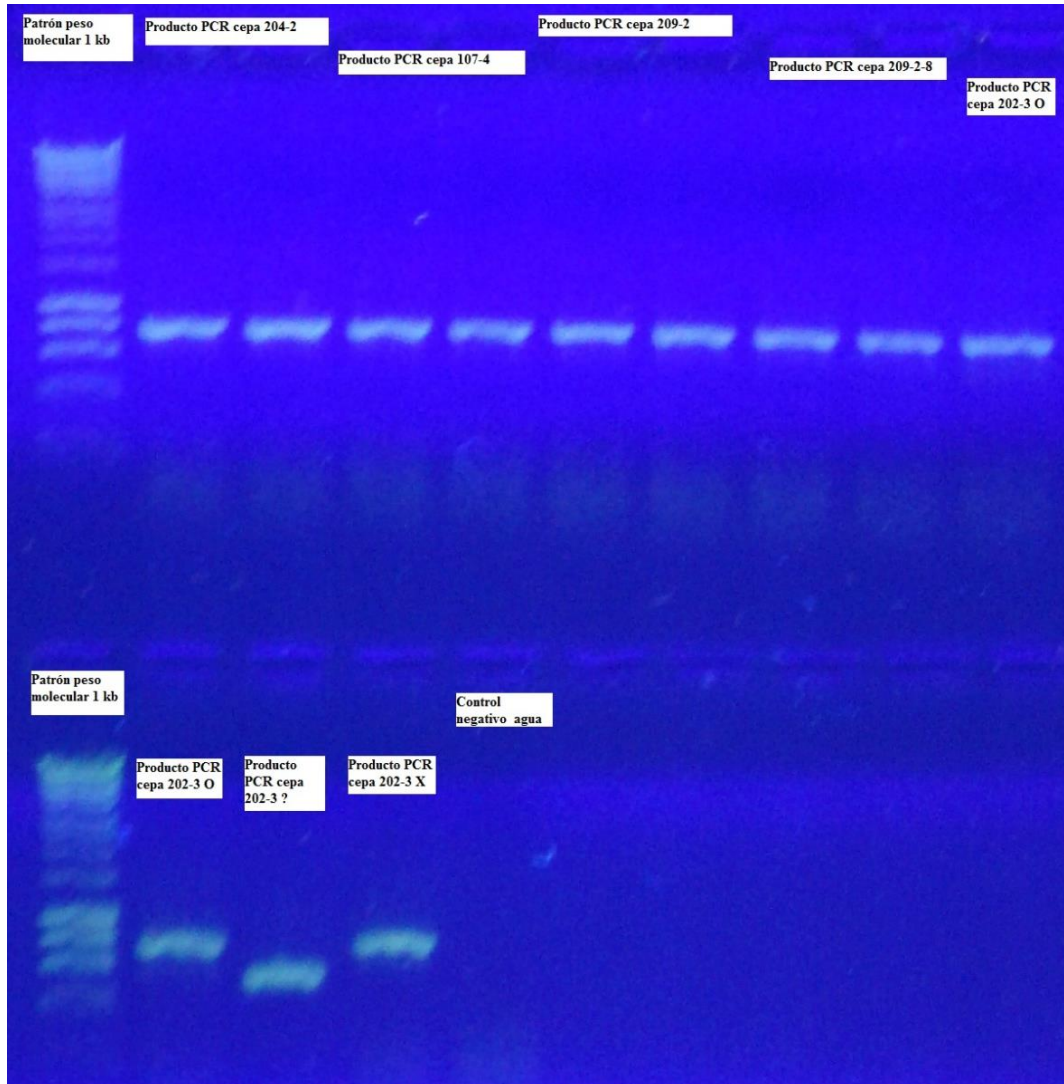
13. Eliminar el etanol y resuspender en 50  $\mu$ l de TE pH 8.0 o agua ultrapura.

### Condiciones para la PCR con la polimerasa Biolase de Boline

#### Condiciones PCR

1. Desnaturalización inicial: 94 ° C por 3 minutos
2. Desnaturalización: 94 ° C por 30 segundos.
3. Anidamiento de primers: 48 ° C por 45 segundos.
4. Extensión: 72 ° C por 60 segundos.
5. Extensión final: 72 ° C a 5 minutos.

Stock	Para una reacción
10X Taq Buffer NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2.5 $\mu$ L
dNTP Mix, 10 mM each	0.5 $\mu$ L
Forward primer 10 $\mu$ M	1.875 $\mu$ L
Reverse primer 10 $\mu$ M	1.875 $\mu$ L
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ L
Template DNA	0.5 $\mu$ L
Taq DNA Polymerase	0.15 $\mu$ L (0.75 U)
Water, nuclease-free	16.1 $\mu$ L
Volumen final	25 $\mu$ L

**Gel de electroforesis realizado para comprobar la amplificación de las secuencias****ITS****Análisis de las secuencias y confirmación de identidad de levaduras**

Para el análisis de las secuencias se empleó el software SnapGene Viewer para ver la calidad de las secuencias analizadas, con esta información se eliminaron las secuencias con baja calidad.

La región seleccionada para la cepa 209-2-8 corresponde a la zona que generó un alineamiento del 100% entre la secuenciación obtenida utilizando el primer ITS1 y la secuenciación utilizando el primer ITS4. Esta secuencia tuvo un tamaño de 292 pares de bases. La secuencia consenso obtenida fue:

Secuencia consenso obtenida para la cepa 209-2-8

```
GGGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAA
AACAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGAT
CTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATT
CCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCCTTTTCAAACATTCTGTTTGGTAG
TGAGTGATACTCTTT
```

Al realizar el análisis en la plataforma BLAST del NCBI se obtuvo que un 99% de identidad para *Saccharomyces cerevisiae*. La información clave del análisis se presenta:

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain ITD0109 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	534	534	100%	5e-148	99%	<a href="#">MH282794.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain LYY internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	534	534	100%	5e-148	99%	<a href="#">MF944081.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 57370 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence</a>	534	534	100%	5e-148	99%	<a href="#">LC413773.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 40211 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence</a>	534	534	100%	5e-148	99%	<a href="#">LC413772.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 40210 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence</a>	534	534	100%	5e-148	99%	<a href="#">LC413771.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 40137 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence</a>	534	534	100%	5e-148	99%	<a href="#">LC413766.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 40098 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence</a>	534	534	100%	5e-148	99%	<a href="#">LC413765.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 40097 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence</a>	534	534	100%	5e-148	99%	<a href="#">LC413764.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 40026 genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA and internal transcribed spacer 2, partial sequence</a>	534	534	100%	5e-148	99%	<a href="#">LC413760.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 40024 genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA and internal transcribed spacer 2, partial sequence</a>	534	534	100%	5e-148	99%	<a href="#">LC413759.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 5782 genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA and internal transcribed spacer 2, partial sequence</a>	534	534	100%	5e-148	99%	<a href="#">LC413757.1</a>

La región seleccionada para la cepa Q1 corresponde a la zona que generó un alineamiento del 100% entre la secuenciación obtenida utilizando el primer ITS1 y la secuenciación utilizando el primer ITS4. Esta secuencia tuvo un tamaño de 709 pares de bases. La secuencia consenso obtenida fue:

Secuencia consenso obtenida para la cepa Q1

```
TGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGA
GTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTT
TCTTGCTATTCCAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAATTA AAA
CCGTTTCAATACAACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGG
CATTGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCAT
TAAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAATATTA AAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT
GCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCCTTCTCAA
ACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCC
```

```
TTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATA
ATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGA
CGGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAAAT
```

Al realizar el análisis en la plataforma BLAST del NCBI se obtuvo que un 100% de identidad para *Saccharomyces cerevisiae*. La información clave del análisis se presenta:

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 40211 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence</a>	1310	1310	100%	0.0	100%	<a href="#">LC413772.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 40137 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence</a>	1310	1310	100%	0.0	100%	<a href="#">LC413766.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 40098 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence</a>	1310	1310	100%	0.0	100%	<a href="#">LC413765.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 40097 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence</a>	1310	1310	100%	0.0	100%	<a href="#">LC413764.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae IFM 5467 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence</a>	1310	1310	100%	0.0	100%	<a href="#">LC413756.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate NC3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2</a>	1310	1310	100%	0.0	100%	<a href="#">MH299867.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus culture CBS 2188 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2</a>	1310	1310	100%	0.0	100%	<a href="#">KY105176.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus culture CBS 1576 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2</a>	1310	1310	100%	0.0	100%	<a href="#">KY105170.1</a>

Con estos análisis fue posible relacionar la identidad de las cepas 209-2-8 y Q1 como pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

## Poster con resultados preliminares de ensayos de suplementación de mieles de caña de azúcar

### Effect of inorganic nutrients supplementation in sugar cane molasses on fusel alcohols production by a *Saccharomyces cerevisiae* native strain



Juan Pablo Ortiz-Rosas<sup>1</sup>, Yina Cifuentes-Triana<sup>1</sup>, Mario Velasquez-Lozano<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Department of Chemical and Environmental Engineering, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. e-mail: [jportizr@unal.edu.co](mailto:jportizr@unal.edu.co)

#### INTRODUCTION

Fusel alcohols include mainly 1-propanol, isobutanol and amyl alcohols. They are usually produced in small amounts during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. These alcohols are produced by catabolic pathway from amino acids [1] and by anabolic pathways from glucose [2]. Recently, isobutanol has obtained great attention because it could be an alternative drop in fuel and it could be use as building block molecule. In order to increase isobutanol production, inorganic nutrients supplementation effects on fermentation were evaluated.

#### MATERIALS AND METHODS

**Yeast.** The native yeast used was isolated in a sugar refinery and characterized as *S. cerevisiae* by amplification of its ITS region.

**Fermentation.** The inoculum was prepared in a YM modified liquid medium, incubated by 24 hours in a rotary shaker (150 rpm, 30°C), then the culture was centrifugated and cells were resuspended in saline solution. The final concentration of cells in fermentation medium was  $5.5 \cdot 10^6$  cells/mL. The experiments were carried out in 50 mL bottles, with an airlock to guarantee anaerobiosis and incubated at 30°C with magnetic agitation for 48 hours. The fermentation medium contained sugar cane molasses diluted with distillate water to 16 °Brix (sucrose:143.4g/L, glucose: 9.0 g/L, fructose: 4.9 g/L). pH final= 4.5. The effect of inorganic nutrients supplementation was investigated through a 2<sup>5</sup> complete factorial design with four blocks and two center points per block. Table 1 shows low and high levels analyzed. The fermentation products were quantified by HPLC.

Nutrient \ Level	-1	0	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	0	1.0	2.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	0	0.5	1.0
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O (g/L)	0	0.20	0.40
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O (g/L)	0	0.10	0.20
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O (g/L)	0	0.075	0.150

Table 1. Levels of nutrients studied .

#### REFERENCES

- [1] Hazelwood L, et al. (1995). The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8):2259-2266.
- [2] Giudici P, et al. (1990). A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 36:61-64.
- [3] Derrick S, Large P (1993). Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched- chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *Journal of General Microbiology*, 139: 2783-2792.

#### RESULTS AND DISCUSSION

**Effect of nutrient supplementation on isobutanol production.** In a Pareto chart is possible to identify that (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and its interaction were the significant factors (Figure 1).

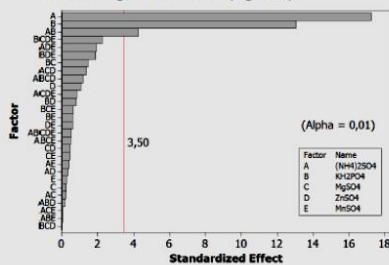


Figure 1. Pareto chart of the standardized effects to isobutanol production

Figure 2 shows that high level of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> increases isobutanol production and high level of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> has the opposite effect.

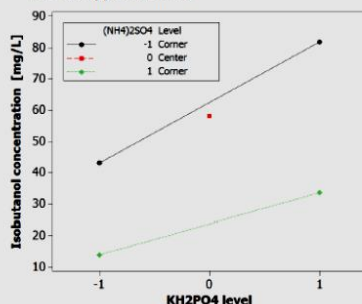


Figure 2. Interaction between (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Derrick and Large [3] found that a limiting of ammonium sulphate levels increase fusel alcohols production (increasing pyruvate intracellular levels). But, no reports were found about the effect of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The production of isoamyl alcohol was affected in the same way as isobutanol.

The production of ethanol and propanol also was mainly affected by (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and its interaction, but in this case high levels of ammonium increase these products and high levels of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> has the same effect. Production of propanol was affected by more factors: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> and several interactions between them.

#### RESULTS AND DISCUSSION

Figure 3 shows not correlation between isobutanol and propanol production (R<sup>2</sup> = 0,0652). In the other hand, isoamyl alcohol and isobutanol production shows a significant correlation (R<sup>2</sup> = 0,7909). This dependence could be attributed to relationship that exists between valine and leucine biosynthetic pathway.

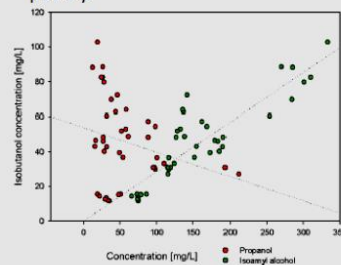


Figure 3. Relation between isobutanol production and propanol or isoamyl alcohol production.

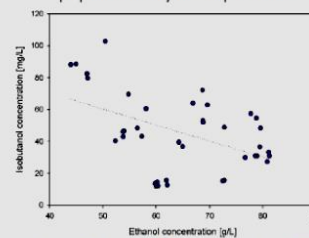


Figure 4. Relation between isobutanol and ethanol production.

Low correlation is observed between ethanol production and isobutanol production (R<sup>2</sup> = 0,2303), but conditions that stimulates isobutanol decrease ethanol production. Ethanol and propanol production was correlated (0,6248).

#### CONCLUSIONS

- \*Isobutanol and Isoamyl alcohol are increased during fermentation by supplementation with 1g/L of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and no addition of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- \*The best condition to produce isobutanol during fermentation of sugar cane molasses was supplementation with: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> y MnSO<sub>4</sub>, increasing isobutanol from 46.6 mg/L to 102.8 mg/L.

**Certificado de depósito cepas obtenidas en el estudio en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana**

 <p>Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana</p>	<p>Pontificia Universidad Javeriana Registro nacional de colecciones N° 148. Registro WFFC y WDMC N° 857</p>	 <p>Pontificia Universidad <b>JAVERIANA</b> Colombiana</p>
<h2>CERTIFICADO DE DEPÓSITO</h2>		
<p><b>Bogotá, D.C; enero 21 de 2019.</b></p>		
<p>La Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (CMPUJ) certifica que los siguientes cultivos fueron entregados por la Universidad Nacional de Colombia y se encuentran depositadas en la Colección desde el día 15 de enero de 2019.</p> <p>El acceso a las cepas es público y podrá ser suministrado a quien lo solicite con fines de docencia e investigación.</p>		
<b>Microorganismo (S)</b>	<b>Código interno</b>	<b>Código (S) CMPUJ</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	209 – 2 – 08	CMPUJ H110
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Q1	CMPUJ H111
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Q1m	CMPUJ H112
		
<p><b>Alba Alicia Trespalacios Rangel Ph.D</b></p>		
<p><b>Directora Colección de Microorganismos Pontificia Universidad Javeriana</b></p>		

## C. Anexo: Información complementaria capítulo 3

### Resultados obtenidos en la realización del diseño experimental Plackett-Burman

Corrida	Bloque	Factores analizados											Productos de fermentación					pH final	
		S. A.	S. P.	S. Mg	S. Zn.	S. Fe	S. Mn.	Tia.	Pir.	Pan.	Bio.	pH	Isobutanol (mg/L)	Glicerol (g/L)	A. acético (g/L)	Etanol (g/L)	A. isoamílico (mg/L)		Biomasa final (g/L)
1	2	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	219,1	5,96	0,38	45,82	109,8	3,4	2,6
2	2	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	152,7	6,40	0,41	45,63	79,0	3,5	2,4
3	2	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	131,1	7,01	0,73	46,03	72,6	2,7	2,4
4	2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	180,4	6,54	0,49	45,60	88,8	3,2	2,5
5	2	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	104,0	7,30	0,77	45,67	60,5	2,4	2,3
6	2	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	121,5	7,26	0,77	45,54	67,8	2,6	2,4
7	2	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	212,7	6,37	0,49	45,56	88,3	3,6	2,6
8	2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	102,5	7,11	0,77	46,17	58,2	2,5	2,3
9	2	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	127,8	7,35	0,79	45,50	63,7	2,5	2,4
10	2	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	149,1	6,42	0,47	45,90	79,3	3,4	2,5
11	2	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	130,4	7,13	0,68	45,87	69,1	2,7	2,3
12	2	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	250,1	5,90	0,34	46,09	121,0	3,8	2,5
13	3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	249,7	5,83	0,34	46,08	115,9	3,7	2,6
14	3	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	132,3	6,90	0,65	45,49	74,9	3,0	2,4
15	3	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	147,4	6,37	0,47	45,99	76,3	3,8	2,6
16	3	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	147,6	6,13	0,38	45,89	73,3	3,8	2,4
17	3	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	120,4	6,94	0,79	45,91	66,8	2,8	2,4
18	3	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	225,8	6,04	0,40	46,15	107,5	3,7	2,6
19	3	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	132,5	6,96	0,74	45,90	74,2	2,9	2,5
20	3	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	127,7	7,03	0,84	45,52	64,7	3,0	2,5
21	3	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	106,7	7,24	0,70	46,10	64,6	2,6	2,3
22	3	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	202,1	6,67	0,47	45,98	80,4	3,7	2,7
23	3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	94,6	6,98	0,76	45,36	57,5	2,5	2,4
24	3	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	193,6	6,36	0,49	45,72	91,8	3,8	2,6
25	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	133,3	7,06	0,75	46,45	73,0	2,7	2,4
26	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	89,7	7,46	0,79	44,40	57,4	2,5	2,4
27	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	175,8	6,49	0,48	46,16	84,6	3,7	2,5

Corrida	Bloque	Factores analizados												Productos de fermentación					pH final
		S. A.	S. P.	S. Mg	S. Zn.	S. Fe	S. Mn.	Tia.	Pir.	Pan.	Bio.	pH	Isobutanol (mg/L)	Glicerol (g/L)	A. acético (g/L)	Etanol (g/L)	A. isoamílico (mg/L)	Biomasa final (g/L)	
28	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	143,6	6,30	0,48	46,21	75,8	3,7	2,5
29	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	135,1	7,03	0,75	46,41	80,4	2,8	2,5
30	1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	140,3	6,61	0,45	46,19	80,0	3,3	2,5
31	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	113,0	7,38	0,79	45,90	69,1	2,7	2,4
32	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	206,1	6,45	0,55	46,04	86,9	3,5	2,7
33	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	129,9	7,39	0,87	45,77	66,8	2,9	2,4
34	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	97,1	7,53	0,75	45,95	61,5	2,5	2,3
35	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	217,8	5,89	0,36	46,25	109,9	3,4	2,6
36	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	242,7	5,88	0,33	46,54	118,9	3,7	2,6

**Reporte obtenido desde el software Minitab 16 para el diseño Plackett-Burman**

**Plackett - Burman Design**

Factors: 11 Replicates: 3  
 Base runs: 12 Total runs: 36  
 Base blocks: 1 Total blocks: 3

**Factorial Fit: Concentración is versus Block, S.A., P.A., ...**

Estimated Effects and Coefficients for Concentración isobutanol [mg/L] (coded units)

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		155.172	0.7165	216.58	0.000
Block 1		-3.139	1.0132	-3.10	0.005
Block 2		1.611	1.0132	1.59	0.126
S.A.	-4.811	-2.406	0.7165	-3.36	0.003
P.A.	73.722	36.861	0.7165	51.45	0.000
S.Mg.	-8.667	-4.333	0.7165	-6.05	0.000
S.Zn.	-10.289	-5.144	0.7165	-7.18	0.000
S.Fe.	7.678	3.839	0.7165	5.36	0.000
S.Mn.	-12.600	-6.300	0.7165	-8.79	0.000
Tia.	-0.833	-0.417	0.7165	-0.58	0.567
Pir.	-4.222	-2.111	0.7165	-2.95	0.007
Pan.	9.933	4.967	0.7165	6.93	0.000
Bio.	23.333	11.667	0.7165	16.28	0.000
pH	45.900	22.950	0.7165	32.03	0.000

S = 4.29883 PRESS = 1088.63  
 R-Sq = 99.48% R-Sq(pred) = 98.61% R-Sq(adj) = 99.17%

Analysis of Variance for Concentración isobutanol [mg/L] (coded units)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Blocks	2	177.4	177.4	88.7	4.80	0.019
Main Effects	11	77627.2	77627.2	7057.0	381.88	0.000
S.A.	1	208.3	208.3	208.3	11.27	0.003
P.A.	1	48914.7	48914.7	48914.7	2646.91	0.000
S.Mg.	1	676.0	676.0	676.0	36.58	0.000
S.Zn.	1	952.8	952.8	952.8	51.56	0.000
S.Fe.	1	530.5	530.5	530.5	28.71	0.000
S.Mn.	1	1428.8	1428.8	1428.8	77.32	0.000
Tia.	1	6.2	6.2	6.2	0.34	0.567
Pir.	1	160.4	160.4	160.4	8.68	0.007
Pan.	1	888.0	888.0	888.0	48.05	0.000
Bio.	1	4900.0	4900.0	4900.0	265.15	0.000
pH	1	18961.3	18961.3	18961.3	1026.05	0.000
Residual Error	22	406.6	406.6	18.5		
Total	35	78211.1				

Unusual Observations for Concentración isobutanol [mg/L]

Obs	StdOrder	Concentración isobutanol [mg/L]	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
24	26	193.600	184.794	2.681	8.806	2.62R

R denotes an observation with a large standardized residual.

**Reporte obtenido desde el software Minitab 16 para el diseño Box-Behnken**

02/12 9:31:15

**Box-Behnken Design**

Factors: 3 Replicates: 1  
 Base runs: 15 Total runs: 15  
 Base blocks: 1 Total blocks: 1

Center points: 3

**Response Surface Regression: Isobutanol [ versus Fosfato diác, Biotina, pH**

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for Isobutanol [mg/L]

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	325.965	10.510	31.015	0.000
Fosfato diácido de K	108.723	6.436	16.893	0.000
Biotina	27.219	6.436	4.229	0.008
pH	43.633	6.436	6.780	0.001
Fosfato diácido de K*	-76.222	9.473	-8.046	0.000
Fosfato diácido de K				
Biotina*Biotina	-20.380	9.473	-2.151	0.084
pH*pH	-8.167	9.473	-0.862	0.428
Fosfato diácido de K*Biotina	12.983	9.102	1.426	0.213
Fosfato diácido de K*pH	21.441	9.102	2.356	0.065
Biotina*pH	6.667	9.102	0.733	0.497

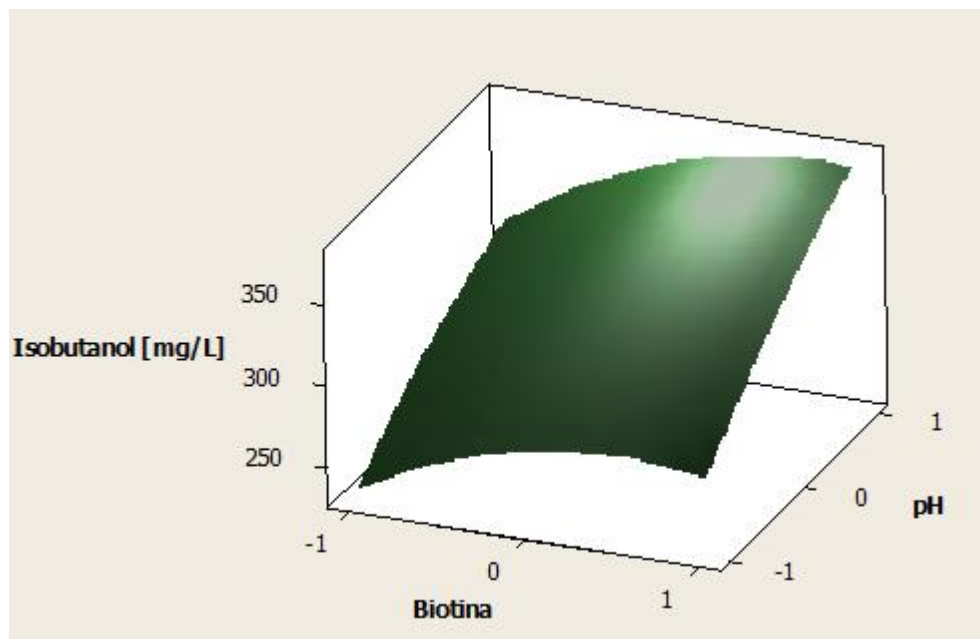
S = 18.2036 PRESS = 19991.4  
 R-Sq = 98.84% R-Sq(pred) = 85.95% R-Sq(adj) = 96.74%

Analysis of Variance for Isobutanol [mg/L]

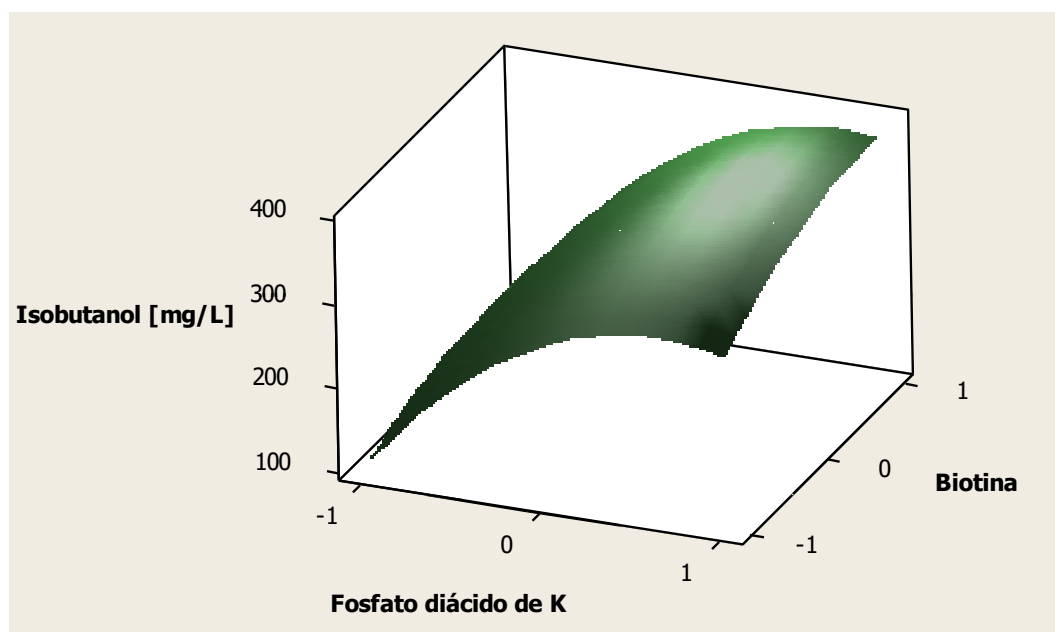
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS
Regression	9	140654	140654	15628.2
Linear	3	115723	115723	38574.3
Fosfato diácido de K	1	94565	94565	94565.3
Biotina	1	5927	5927	5926.8
pH	1	15231	15231	15230.7
Square	3	22240	22240	7413.5
Fosfato diácido de K*Fosfato diácido de K	1	20545	21452	21451.7
Biotina*Biotina	1	1449	1534	1533.6
pH*pH	1	246	246	246.3
Interaction	3	2691	2691	896.9
Fosfato diácido de K*Biotina	1	674	674	674.2
Fosfato diácido de K*pH	1	1839	1839	1838.8
Biotina*pH	1	178	178	177.8
Residual Error	5	1657	1657	331.4
Lack-of-Fit	3	1183	1183	394.3
Pure Error	2	474	474	237.0
Total	14	142311		

Source	F	P
Regression	47.16	0.000
Linear	116.41	0.000
Fosfato diácido de K	285.38	0.000
Biotina	17.89	0.008
pH	45.96	0.001
Square	22.37	0.003

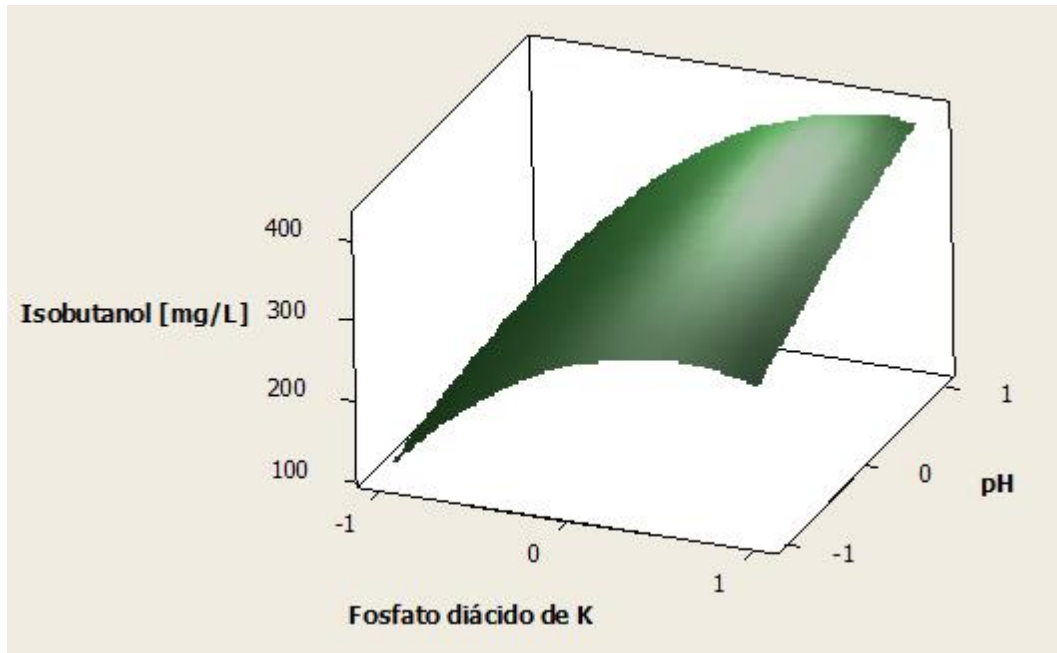
**Superficie de respuesta para la producción de isobutanol con pH y biotina como variables independientes, generada por el software Minitab16**



**Superficie de respuesta para la producción de isobutanol con fosfato diácido de potasio y biotina como variables independientes, generada por el software Minitab16**



**Superficie de respuesta para la producción de isobutanol con fosfato diácido de potasio y pH como variables independientes, generada por el software Minitab16**



## Bibliografía

- [1] E. Christensen, J. Yanowitz, M. Ratcliff, and R. L. McCormick, "Renewable oxygenate blending effects on gasoline properties," *Energy and Fuels*, vol. 25, no. 10, pp. 4723–4733, 2011.
- [2] L. Tao *et al.*, "Techno-economic analysis and life-cycle assessment of cellulosic isobutanol and comparison with cellulosic ethanol and n-butanol," *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, vol. 8, no. 1, pp. 30–48, Jan. 2014.
- [3] Y. Zhang *et al.*, "Production of jet and diesel biofuels from renewable lignocellulosic biomass," *Appl. Energy*, 2015.
- [4] K. Atsonios, M.-A. Kougoumtzis, K. D. Panopoulos, and E. Kakaras, "Alternative thermochemical routes for aviation biofuels via alcohols synthesis: Process modeling, techno-economic assessment and comparison," *Appl. Energy*, vol. 138, pp. 346–366, 2015.
- [5] J. D. Taylor, M. M. Jenni, and M. W. Peters, "Dehydration of Fermented Isobutanol for the Production of Renewable Chemicals and Fuels," *Top. Catal.*, vol. 53, no. 15–18, pp. 1224–1230, May 2010.
- [6] S. Atsumi, T. Hanai, and J. C. Liao, "Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels.," *Nature*, vol. 451, no. 7174, pp. 86–9, Jan. 2008.
- [7] S. Yamamoto, M. Suda, S. Niimi, M. Inui, and H. Yukawa, "Strain optimization for efficient isobutanol production using *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 110, no. 11, pp. 2938–48, Nov. 2013.
- [8] H. Qi, S. Li, S. Zhao, D. Huang, M. Xia, and J. Wen, "Model-driven redox pathway manipulation for improved isobutanol production in *Bacillus subtilis* complemented with experimental validation and metabolic profiling analysis.," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e93815, Jan. 2014.
- [9] P. P. Lin *et al.*, "Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*," *Metab. Eng.*, vol. 31, pp. 44–52, 2015.
- [10] W. Siripong *et al.*, "Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of isobutanol and isobutyl acetate," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, no. 1, pp. 1–16, 2018.
- [11] S. K. Hammer and J. L. Avalos, "Uncovering the role of branched-chain amino acid transaminases in *Saccharomyces cerevisiae* isobutanol biosynthesis," *Metab. Eng.*, vol. 44, no. October, pp. 302–312, 2017.

- 
- [12] S. Derrick and P. J. Large, "Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source.," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 139, no. 11, pp. 2783–92, Nov. 1993.
- [13] L. Hazelwood and J. Daran, "The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism," *Appl. ....*, vol. 74, no. 8, pp. 2259–2266, 2008.
- [14] X. Chen, K. F. Nielsen, I. Borodina, M. C. Kielland-Brandt, and K. Karhumaa, "Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism.," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 4, no. 1, p. 21, Jan. 2011.
- [15] J. R. Dickinson, S. J. Harrison, and M. J. E. Hewlins, "An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 40, pp. 25751–6, Oct. 1998.
- [16] N. Takpho, D. Watanabe, and H. Takagi, "High-level production of valine by expression of the feedback inhibition-insensitive acetohydroxyacid synthase in *Saccharomyces cerevisiae*," *Metab. Eng.*, vol. 46, no. November 2017, pp. 60–67, 2018.
- [17] L. C. Basso, H. V de Amorim, A. J. de Oliveira, and M. L. Lopes, "Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil.," *FEMS Yeast Res.*, vol. 8, no. 7, pp. 1155–63, Nov. 2008.
- [18] J. Steensels, T. Snoek, E. Meersman, M. P. Nicolino, K. Voordeckers, and K. J. Verstrepen, "Improving industrial yeast strains: Exploiting natural and artificial diversity," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 38, no. 5, pp. 947–995, Apr. 2014.
- [19] H. Hahn, G. Dämbkes, N. Rupprich, H. Bahl, and G. Frey, "Butanols," in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2005, pp. 1–13.
- [20] H. Liu, X. Cui, Y. Zhang, T. Feng, and K. Zhang, "Isobaric Vapor-Liquid Equilibrium for the Binary and Ternary System with Isobutyl Alcohol, Isobutyl Acetate and Dimethyl Sulfoxide at 101.3 kPa," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 62, no. 6, pp. 1902–1909, 2017.
- [21] H. Kuhz, A. Kuenz, U. Prüße, T. Willke, and K.-D. Vorlop, "Products Components: Alcohols," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2017.
- [22] A. Irimescu, "Performance and fuel conversion efficiency of a spark ignition engine fueled with iso-butanol," *Appl. Energy*, vol. 96, pp. 477–483, 2012.
- [23] Y. Li, Y. Yu, Z. Wang, and J. Wang, "Physical and chemical properties of isobutanol-gasoline blends," *Environ. Prog. Sustain. Energy*, vol. 34, no. 3, pp. 908–914, 2015.
- [24] H. Li, A. F. Cann, and J. C. Liao, "Biofuels: biomolecular engineering fundamentals and advances.," *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 1, pp. 19–36, Jan. 2010.
- [25] S. E. Mainguet and J. C. Liao, "Bioengineering of microorganisms for C<sub>3</sub> to C<sub>5</sub>

- alcohols production.,” *Biotechnol. J.*, vol. 5, no. 12, pp. 1297–1308, Dec. 2010.
- [26] J. C. Serrano-Ruiz and J. A. Dumesic, “Catalytic routes for the conversion of biomass into liquid hydrocarbon transportation fuels,” *Energy Environ. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 83–99, 2011.
- [27] M. W. Peters and J. D. Taylor, “Renewable jet fuel blendstock from isobutanol,” US Patent 8373012, 2013.
- [28] R. Mawhood, E. Gazis, S. de Jong, R. Hoefnagels, and R. Slade, “Production pathways for renewable jet fuel: a review of commercialization status and future prospects,” *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 10, no. 4, pp. 462–484, 2016.
- [29] B. J. Eikmanns and B. Blombach, “Isobutanol,” in *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*, Wiley-Blackwell, 2014, pp. 327–352.
- [30] Z. Lin, V. Nikolakis, and M. Ierapetritou, “Alternative approaches for p-xylene production from starch: Techno-economic analysis,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 53, no. 26, pp. 10688–10699, 2014.
- [31] S. Ostergaard, L. Olsson, and J. Nielsen, “Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Microbiol. Mol. ...*, vol. 64, no. 1, pp. 34–50, 2000.
- [32] J. Nielsen and M. C. Jewett, “Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 122–31, Feb. 2008.
- [33] E. Nevoigt, “Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 72, no. 3, pp. 379–412, Sep. 2008.
- [34] M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl, and D. Clark, “Eukaryotic Cell Biology and Eukaryotic Microorganisms,” in *Brock Biology of microorganisms*, Thirteenth., 2012, pp. 584–612.
- [35] I. Herskowitz, “Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *Microbiol. Rev.*, vol. 52, no. 4, pp. 536–53, Dec. 1988.
- [36] J. E. Haber, “Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Genetics*, vol. 191, no. 1, pp. 33–64, May 2012.
- [37] M. E. Walker, J. M. Gardner, A. Vystavelova, C. McBryde, M. D. B. Lopes, and V. Jiranek, “Application of the reusable, KanMX selectable marker to industrial yeast: Construction and evaluation of heterothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*, possessing minimal foreign DNA sequences,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 4, no. 3, pp. 339–347, 2003.
- [38] Y. Tamai, K. Tanaka, Y. Kaneko, and S. Harashima, “HO gene polymorphism in *Saccharomyces* industrial yeasts and application of novel HO genes to convert homothallism to heterothallism in combination with the mating-type detection cassette,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 55, no. 3, pp. 333–340, Apr. 2001.
- [39] M. Waites, N. Morgan, J. Rockey, and G. Higton, “Microbial growth and nutrition,” in

- Industrial Microbiology: An introduction*, 2001, pp. 21–45.
- [40] O. Frick and C. Wittmann, "Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative <sup>13</sup>C flux analysis," *Microb. Cell Fact.*, vol. 4, pp. 1–16, 2005.
- [41] H. Kitagaki, "Mitochondrial-morphology-targeted breeding of industrial yeast strains for alcohol fermentation.," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 53, no. Pt 3, pp. 145–153, 2009.
- [42] W. Visser, A. A. van der Baan, W. Batenburg-van der Vegte, W. A. Scheffers, R. Kramer, and J. P. v. Dijken, "Involvement of mitochondria in the assimilatory metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* cultures," *Microbiology*, vol. 140, no. 11, pp. 3039–3046, Nov. 1994.
- [43] J. Dynesen, H. P. Smits, L. Olsson, and J. Nielsen, "Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose, and mannose," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 50, no. 5, pp. 579–82, Nov. 1998.
- [44] E. Nevoigt and U. Stahl, "Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 21, no. 3, pp. 231–241, 1997.
- [45] M. C. Ferreira, A. J. a. Meirelles, and E. a. C. Batista, "Study of the Fusel Oil Distillation Process," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, no. 6, pp. 2336–2351, Feb. 2013.
- [46] G. Kłosowski *et al.*, "Influence of various yeast strains and selected starchy raw materials on production of higher alcohols during the alcoholic fermentation process," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 240, no. 1, pp. 233–242, 2014.
- [47] A. Patil, S. Koolwal, and H. Butala, "Fusel oil: composition, removal and potential utilization," *Int. sugar J.*, vol. 104, pp. 51–58, 2002.
- [48] N. Montoya, J. Durán, F. Córdoba, I. D. Gil, C. A. Trujillo, and G. Rodríguez, "Colombian fusel oil," *Ing. e Investig.*, vol. 36, no. 2, p. 21, Aug. 2016.
- [49] A. F. Cann and J. C. Liao, "Pentanol isomer synthesis in engineered microorganisms.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 85, no. 4, pp. 893–9, Jan. 2010.
- [50] P. Giudici, P. Romano, and C. Zambonelli, "A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*," *Can. J. Microbiol.*, vol. 36, no. 1, pp. 61–4, Jan. 1990.
- [51] J. Wess, M. Brinek, and E. Boles, "Improving isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by successively blocking competing metabolic pathways as well as ethanol and glycerol formation," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 12, no. 1, pp. 1–15, 2019.
- [52] S.-H. H. Park, S. Kim, and J.-S. S. Hahn, "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of isobutanol and 3-methyl-1-butanol.," *Appl. Microbiol.*

- Biotechnol.*, vol. 98, no. 21, pp. 9139–9147, Nov. 2014.
- [53] Y.-T. Lee and R. G. Duggleby, “Mutations in the regulatory subunit of yeast acetohydroxyacid synthase affect its activation by MgATP.,” *Biochem. J.*, vol. 395, no. 2, pp. 331–6, Apr. 2006.
- [54] K. M. Smith and J. C. Liao, “An evolutionary strategy for isobutanol production strain development in *Escherichia coli*.,” *Metab. Eng.*, vol. 13, no. 6, pp. 674–81, Nov. 2011.
- [55] C. Felpeto-Santero, A. Rojas, M. Tortajada, B. Galán, D. Ramón, and J. L. García, “Engineering alternative isobutanol production platforms,” *AMB Express*, vol. 5, no. 1, p. 32, Dec. 2015.
- [56] X. Li, C. R. Shen, and J. C. Liao, “Isobutanol production as an alternative metabolic sink to rescue the growth deficiency of the glycogen mutant of *Synechococcus elongatus* PCC 7942,” *Photosynth. Res.*, vol. 120, no. 3, pp. 301–310, 2014.
- [57] C. T. Trinh, J. Li, H. W. Blanch, and D. S. Clark, “Redesigning *Escherichia coli* metabolism for anaerobic production of isobutanol.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 14, pp. 4894–904, Jul. 2011.
- [58] K. M. Smith, K. M. Cho, and J. C. Liao, “Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 87, no. 3, pp. 1045–1055, 2010.
- [59] D. Brat, C. Weber, W. Lorenzen, H. B. Bode, and E. Boles, “Cytosolic re-localization and optimization of valine synthesis and catabolism enables increased isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 5, no. 1, p. 65, Jan. 2012.
- [60] J. L. Avalos, G. R. Fink, and G. Stephanopoulos, “Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 31, no. 4, pp. 335–41, Apr. 2013.
- [61] E. Ofuonye, K. Kutin, and D. T. Stuart, “Engineering *Saccharomyces cerevisiae* fermentative pathways for the production of isobutanol,” *Biofuels*, vol. 4, no. 2, pp. 185–201, 2013.
- [62] S. H. Park, S. Kim, and J. S. Hahn, “Improvement of isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by increasing mitochondrial import of pyruvate through mitochondrial pyruvate carrier,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 17, pp. 7591–7598, 2016.
- [63] S. Bastian, X. Liu, J. T. Meyerowitz, C. D. Snow, M. M. Y. Chen, and F. H. Arnold, “Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in *Escherichia coli*.,” *Metab. Eng.*, vol. 13, no. 3, pp. 345–52, May 2011.
- [64] S. Parekh, V. a Vinci, and R. J. Strobel, “Improvement of microbial strains and fermentation processes.,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 54, no. 3, pp. 287–301, Sep. 2000.

- 
- [65] J. L. Adrio and A. L. Demain, "Genetic improvement of processes yielding microbial products.," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 30, no. 2, pp. 187–214, Mar. 2006.
- [66] A. Demain and J. Adrio, "Strain improvement for production of pharmaceuticals and other microbial metabolites by fermentation," *Nat. Compd. as Drugs Vol. I*, vol. 65, pp. 253–289, 2008.
- [67] B. A. Kunz *et al.*, "Defects in base excision repair combined with elevated intracellular dCTP levels dramatically reduce mutation induction in yeast by ethyl methanesulfonate and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 32, no. 2, pp. 173–178, 1998.
- [68] S. Pospíšil, J. Kopecký, and V. Prikrylová, "Derepression and altered feedback regulation of valine biosynthetic pathway in analogue-resistant mutants of *Streptomyces cinnamonensis* resulting in 2-ketoisovalerate excretion," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 85, no. 1, pp. 9–16, Jul. 1998.
- [69] C. Ramos and I. L. Calderon, "Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 58, no. 5, pp. 1677–82, May 1992.
- [70] M. Watanabe, K. Fukuda, K. Asano, and S. Ohta, "Mutants of bakers' yeasts producing a large amount of isobutyl alcohol or isoamyl alcohol, flavour components of bread," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 34, no. 2, pp. 154–159, 1990.
- [71] M. Mobini-Dehkordi, I. Nahvi, H. Zarkesh-Esfahani, K. Ghaedi, M. Tavassoli, and R. Akada, "Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 105, no. 4, pp. 403–8, Apr. 2008.
- [72] G. Katre, N. Ajmera, S. Zinjarde, and A. RaviKumar, "Mutants of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 grown on waste cooking oil as a biofactory for biodiesel production," *Microb. Cell Fact.*, vol. 16, no. 1, p. 176, 2017.
- [73] M. Dragosits and D. Mattanovich, "Adaptive laboratory evolution -- principles and applications for biotechnology," *Microb Cell Fact*, vol. 12, p. 64, 2013.
- [74] R. Mans, J. M. G. Daran, and J. T. Pronk, "Under pressure: evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 50, pp. 47–56, 2018.
- [75] G. Stephanopoulos, "Metabolic engineering by genome shuffling," *Nat. Biotechnol.*, vol. 20, p. 666, Jul. 2002.
- [76] T. Snoek *et al.*, "Large-scale robot-assisted genome shuffling yields industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with increased ethanol tolerance," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 8, no. 1, pp. 1–19, 2015.
- [77] B. E. Della-Bianca, T. O. Basso, B. U. Stambuk, L. C. Basso, and A. K. Gombert, "What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry?,"

- Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 3, pp. 979–91, Feb. 2013.
- [78] B. Oud, A. J. A. van Maris, J.-M. M. Daran, and J. T. Pronk, “Genome-wide analytical approaches for reverse metabolic engineering of industrially relevant phenotypes in yeast.,” *FEMS Yeast Res*, vol. 12, no. 2, pp. 183–96, Mar. 2012.
- [79] S. P. Zou *et al.*, “Mutagenesis breeding of high echinocandin B producing strain and further titer improvement with culture medium optimization,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 38, no. 10, pp. 1845–1854, 2015.
- [80] H. Takagi, F. Iwamoto, and S. Nakamori, “Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants.,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 47, no. 4, pp. 405–11, Apr. 1997.
- [81] R. Kumari and K. Pramanik, “Improvement of multiple stress tolerance in yeast strain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production.,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 114, no. 6, pp. 622–9, Dec. 2012.
- [82] J. A. McCourt, S. S. Pang, J. King-Scott, L. W. Guddat, and R. G. Duggleby, “Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 3, pp. 569–573, 2006.
- [83] D. A. Treco and F. Winston, “Growth and Manipulation of Yeast,” *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. 82, no. 1, pp. 13.2.1-13.2.12, Apr. 2008.
- [84] V. Lundblad and K. Struhl, “Yeast,” *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. 92, no. 1, pp. 13.0.1-13.0.4, Oct. 2010.
- [85] C. Illuxley, E. Green, and I. Dunbam, “Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR,” *Trends Genet.*, vol. 6, no. 8, p. 63110, 1990.
- [86] F. Winston, “EMS and UV mutagenesis in yeast.,” *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. Chapter 13, no. April, p. Unit 13.3B, Apr. 2008.
- [87] J. F. T. Spencer and D. M. Spencer, “Mutagenesis in yeast.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 53, pp. 17–38, Jan. 1996.
- [88] C. A. Bilinski, A. M. Sills, and G. G. Stewart, “Morphological and genetic effects of benomyl on polyploid brewing yeasts: Isolation of auxotrophic mutants,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 48, no. 4, pp. 813–817, 1984.
- [89] J. Goldemberg and S. Paulo, “The potential for first-generation ethanol production,” *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, vol. 4, pp. 17–24, 2010.
- [90] E. E. Vidal, G. M. de Billerbeck, D. A. Simões, A. Schuler, J. M. François, and M. A. de Moraes, “Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation.,” *Food Chem.*, vol. 138, no. 1, pp. 701–8, May 2013.
- [91] E. S. C. O’Connor-Cox, J. Paik, and W. M. Ingledew, “Improved ethanol yields through supplementation with excess assimilable nitrogen,” *J. Ind. Microbiol.*, vol. 8,

- no. 1, pp. 45–52, Jul. 1991.
- [92] A. M. A. M. Jones, K. C. Thomas, and W. M. Ingledew, "Ethanol Fermentation of Blackstrap Molasses and Sugarcane Juice Using Very High Gravity Technology," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 42, no. 5, pp. 1242–1246, 1994.
- [93] B. T. L. Lucena, E. A. Silva-Filho, M. R. M. Coimbra, J. O. F. Morais, D. A. Simões, and M. A. Morais, "Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions," *Genet. Mol. Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 1072–1084, 2007.
- [94] S. J. Rodriguez Gonzalez, "Evaluación del potencial fermentativo de levaduras nativas para la producción de etanol a partir de mieles de caña de azúcar," Universidad Nacional de Colombia, 2015.
- [95] F. Sherman, "Getting started with yeast," *Methods Enzymol.*, vol. 350, pp. 3–41, 2002.
- [96] M. Day, "Yeast Petites and Small Colony Variants," in *Advances in Applied Microbiology*, 2013, pp. 1–41.
- [97] C. L. Jenkins, S. J. Lawrence, A. I. Kennedy, P. Thurston, J. A. Hodgson, and K. A. Smart, "Incidence and formation of petite mutants in lager brewing yeast *saccharomyces cerevisiae* (Syn. *S. Pastorianus*) populations," *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, vol. 67, no. 2, pp. 72–80, 2009.
- [98] V. C. B. Reis, A. M. Nicola, O. De Souza Oliveira Neto, V. D. F. Batista, L. M. P. De Moraes, and F. A. G. Torres, "Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 11, pp. 1673–1683, 2012.
- [99] M. R. Connor, A. F. Cann, and J. C. Liao, "3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 86, no. 4, pp. 1155–64, Apr. 2010.
- [100] G. Romagnoli *et al.*, "Substrate specificity of thiamine pyrophosphate-dependent 2-oxo-acid decarboxylases in *Saccharomyces cerevisiae*," *Appl. Env. Microbiol.*, vol. 78, no. 21, pp. 7538–7548, Nov. 2012.
- [101] Q. Xie and a Jiménez, "Molecular cloning of a novel allele of SMR1 which determines sulfometuron methyl resistance in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 137, no. 2–3, pp. 165–8, Apr. 1996.
- [102] J. Ambrona, M. Maqueda, E. Zamora, and M. Ramírez, "Sulfometuron Resistance as a Genetic Marker for Yeast Populations in Wine Fermentations," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 19, pp. 7438–7443, Sep. 2005.
- [103] S. Falco and K. Dumas, "Genetic analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the herbicide sulfometuron methyl," *Genetics*, vol. 109, no. 1, pp. 21–35,

1985.

- [104] E. Toksoy Öner, S. G. Oliver, and B. Kırdar, "Production of Ethanol from Starch by Respiration-Deficient Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 10, pp. 6443 LP – 6445, Oct. 2005.
- [105] A. Hutter and S. G. Oliver, "Ethanol production using nuclear petite yeast mutants," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 49, no. 5, pp. 511–516, 1998.
- [106] L. Murashchenko, C. Abbas, K. Dmytruk, and A. Sibirny, "Overexpression of the truncated version of ILV2 enhances glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, vol. 33, no. 8, pp. 463–469, Aug. 2016.
- [107] S. Hashimoto and M. Ogura, "Isolation of auxotrophic mutants of diploid industrial yeast strains after UV mutagenesis," *Appl. ...*, vol. 75, no. 1, pp. 312–319, 2005.
- [108] B. Y. Jeong, C. Wittmann, T. Kato, and E. Y. Park, "Comparative metabolic flux analysis of an *Ashbya gossypii* wild type strain and a high riboflavin-producing mutant strain," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 119, no. 1, pp. 101–106, 2015.
- [109] R. Ledesma-Amaro, C. Serrano-Amatriain, A. Jiménez, and J. L. Revuelta, "Metabolic engineering of riboflavin production in *Ashbya gossypii* through pathway optimization," *Microb. Cell Fact.*, vol. 14, no. 1, p. 163, 2015.
- [110] D. González-Ramos *et al.*, "Genome-scale analyses of butanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* reveal an essential role of protein degradation.," *Biotechnol Biofuels*, vol. 6, no. 1, p. 48, Jan. 2013.
- [111] S. Swinnen *et al.*, "Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis," *Genome Res.*, vol. 22, no. 5, pp. 975–984, 2012.
- [112] D. González-Ramos *et al.*, "A new laboratory evolution approach to select for constitutive acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of causal mutations," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 9, no. 1, pp. 1–18, 2016.
- [113] J. F. T. Spencer and D. M. Spencer, "Rare-Mating and Cytoduction in *Saccharomyces cerevisiae* BT - Yeast Protocols: Methods in Cell and Molecular Biology," I. H. Evans, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 1996, pp. 39–44.
- [114] J. R. Bellon, F. Schmid, D. L. Capone, B. L. Dunn, and P. J. Chambers, "Introducing a New Breed of Wine Yeast: Interspecific Hybridisation between a Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast and *Saccharomyces mikatae*," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, 2013.
- [115] J. R. Bellon *et al.*, "Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavour and aroma diversity to wines," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 91, no. 3, pp. 603–612, 2011.
- [116] D. Weuster-Botz, "Experimental design for fermentation media development:

- Statistical design or global random search?," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 90, no. 5, pp. 473–483, 2000.
- [117] M. Kennedy and D. Krouse, "Strategies for improving fermentation medium performance: A review," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 23, no. 6, pp. 456–475, 1999.
- [118] S. Dayana Priyadharshini and A. K. Bakthavatsalam, "Optimization of phenol degradation by the microalga *Chlorella pyrenoidosa* using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology," *Bioresour. Technol.*, vol. 207, pp. 150–156, 2016.
- [119] L. A. Al-Madboly, E. G. Khedr, and S. M. Ali, "Optimization of reduced glutathione production by a *Lactobacillus plantarum* isolate using Plackett-Burman and Box-Behnken designs," *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. MAY, 2017.
- [120] F. B. Pereira, P. M. R. R. Guimarães, J. A. Teixeira, and L. Domingues, "Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 20, pp. 7856–7863, Oct. 2010.
- [121] D. Montgomery, "Diseños factoriales fraccionados de dos niveles," in *Diseño y análisis de experimentos*, Segunda ed., Limusa Wiley, 2004, pp. 343–347.
- [122] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, and L. A. Escaleira, "Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry," *Talanta*, vol. 76, no. 5, pp. 965–977, Sep. 2008.
- [123] S. L. C. Ferreira *et al.*, "Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods," *Anal. Chim. Acta*, vol. 597, no. 2, pp. 179–186, Aug. 2007.
- [124] D. Gangadharan, S. Sivaramakrishnan, K. M. Nampoothiri, R. K. Sukumaran, and A. Pandey, "Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 11, pp. 4597–4602, 2008.
- [125] J. Job, R. K. Sukumaran, and K. Jayachandran, "Production of a highly glucose tolerant  $\beta$ -glucosidase by *Paecilomyces variotii* MG3: Optimization of fermentation conditions using Plackett-Burman and Box-Behnken experimental designs," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 8, pp. 1385–1391, 2010.
- [126] W. Q. Guo *et al.*, "Optimization of culture conditions for hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49 using response surface methodology," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 3, pp. 1192–1196, 2009.
- [127] C. Verduyn, E. Postma, W. A. Scheffers, J. P. van Dijken, and J. P. Dijken, "Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures.," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 136, no. 3, pp. 395–403, Mar. 1990.
- [128] C. Verduyn, E. Postma, W. A. Scheffers, and J. P. van Dijken, "Effect of benzoic acid

- on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation,” *Yeast*, vol. 8, 1992.
- [129] L. Gutierrez, “Effect of some vitamins and micronutrient deficiencies on the production of higher alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*,” *Sci. Agric.*, vol. 50, pp. 484–489, 1993.
- [130] R. Li, G. Xiong, S. Yuan, Z. Wu, Y. Miao, and P. Weng, “Investigating the underlying mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* in response to ethanol stress employing RNA-seq analysis,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, no. 11, pp. 1–13, 2017.
- [131] J. C. Bohlscheid, J. K. Fellman, X. D. Wang, D. Ansen, and C. G. Edwards, “The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 102, no. 2, pp. 390–400, Feb. 2007.
- [132] P. Romano, G. Suzzi, L. Turbanti, and M. Polsinelli, “Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 118, no. 3, pp. 213–218, 1994.
- [133] V. K. Jain, B. Divol, B. A. Prior, and F. F. Bauer, “Effect of alternative NAD<sup>+</sup>-regenerating pathways on the formation of primary and secondary aroma compounds in a *Saccharomyces cerevisiae* glycerol-defective mutant,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 93, no. 1, pp. 131–141, Jan. 2012.
- [134] J. T. J. Pronk, H. Y. H. Steensma, J. P. Van Dijken, and J. Van Dijken, “Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Yeast*, vol. 12, no. 16, pp. 1607–1633, 1996.
- [135] L. Laopaiboon, P. Thanonkeo, P. Jaisil, and P. Laopaiboon, “Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 23, no. 10, pp. 1497–1501, Apr. 2007.
- [136] C. L. Fernández-López *et al.*, “Use of sugarcane molasses ‘B’ as an alternative for ethanol production with wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 at high sugar concentrations,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 35, no. 4, pp. 605–614, May 2012.
- [137] G. Laimer, Ed., “Chapter 27. Malt beverages and brewing materials. AOAC 945.30,” in *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 19<sup>th</sup> Edit., 2012, p. 39.
- [138] S. Lie, “The EBC-NINHYDRIN METHOD FOR DETERMINATION OF FREE ALPHA AMINO NITROGEN,” *J. Inst. Brew.*, vol. 79, no. 1, pp. 37–41, Jan. 1973.
- [139] M. Maqueda, E. Zamora, N. Rodríguez-Cousiño, and M. Ramírez, “Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA,” *Food Microbiol.*, vol. 27, no. 2, pp. 205–209, 2010.

