



SOBREEXPRESION DE LOS GENES *ADH1* y *HXT1* EN LEVADURAS DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA MEJORAR LA EFICIENCIA EN LA PRODUCCION DE TEQUILA

Melesio Gutiérrez Lomelí, José de Jesús Ramírez Córdova, Carlos Pelayo Ortiz, Zazil Yadel Escalante García, Rosa Isela Corona González, Luis Rodrigo Lezama Gutiérrez

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Unidad de Biotecnología, Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, C.P. 44270 Guadalajara, Jalisco, México. yeast1960@yahoo.com

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, *Agave tequilana* Weber variedad azul, Eficiencia fermentativa.

Introducción. *Saccharomyces cerevisiae* es la principal responsable de la producción de etanol durante la fermentación de mostos de agave para la producción de tequila. Frecuentemente la fermentación alcohólica es lenta e incompleta, probablemente causada por el transporte de hexosas (1), ya que Hxt1p es uno de los transportadores más importantes en condiciones fermentativas, y fuertemente inducida a altas concentraciones de glucosa durante la fase de crecimiento (2). La sobreexpresión simultánea de enzimas glucolíticas se ha utilizado para incrementar la síntesis de etanol pero no ha tenido éxito.

Objetivo. En este estudio los genes *ADH1* y *HXT1* fueron colocados y expresados en una cepa de *S. cerevisiae*, con el objeto de mejorar la eficiencia fermentativa durante la producción de tequila.

Metodología. Se aisló el ADN genómico de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* AR5 de acuerdo a protocolos estándar y usados para aislamiento de secuencias de *ADH1*, *HXT7* y *HXT1*. El plásmido del centrómero de la levadura pJRC34 se construyó por inserción de los fragmentos 3.3-kb HindIII, llevándolo el gen de la fosfotransferasa HygB (3). El gen *ADH1* y su promotor se recuperaron por PCR usando los oligonucleótidos olis5adh1sc y olia5adh1sc clonados en el vector TOPO pCR 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y secuenciados. Los cultivos de las cepas transformadas y no transformadas de AR5 se realizaron aeróbicamente en matraces erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 200 ml de Medio YPD o *A. tequilana* ajustado a 100 g de azúcares reductores/L con agitación por 18 horas a 30°C.

Resultados y discusión. El crecimiento de las cepas recombinantes decreció ligeramente por el efecto de transformación, respecto al crecimiento de AR5. En las cepas recombinantes A3 y A5 que contenían *HXT1* se observó un descenso en el rendimiento Yx/s. El grado de sobreexpresión de los genes *ADH1* y *HXT1* varió entre las diferentes cepas recombinantes. Los niveles de transcripción se incrementaron cuando los genes *ADH1* y *HXT1* fueron sobreexpresados individualmente en las cepas transformadas A1 y A3, respectivamente. Por el

contrario, los niveles de sobreexpresión disminuyeron cuando ambos genes fueron expresados simultáneamente en la cepa A5. La producción de etanol fue mas baja en la cepa A1, mientras que los rendimientos Yp/s para las cepas A3 y A5 se incrementaron respecto a la cepa AR5 con *Agave tequilana*. Los rendimientos Yp/s se incrementaron ligeramente en las 3 cepas recombinantes respecto a AR5 cuando el medio utilizado fue YPD (Cuadro 1). La producción de glicerol se incrementó cuando el gen *HXT1* fue sobreexpresado en las cepas transformadas A3 y A5 cuando se cultivaron en medio YPD y medio con Agave.

Cuadro 1. Valores de producción, rendimiento y eficiencia de etanol presentados por las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* crecidas en medio YPD y *A. tequilana* Weber variedad azul.

Cepa	Producción de etanol (g/L)	Yp/s (g/g)	Eficiencia (%)
AR5-YPD	46.16±2.97	0.411±0.005	80.33±0.22
A1-YPD	45.92±2.19	0.420±0.006	82.25±0.31
A3-YPD	44.56±3.18	0.425±0.002	83.27±0.25
A5-YPD	45.37±3.03	0.432±0.006	84.57±0.35
AR5-Agave	43.65±2.05	0.456±0.006	89.40±0.33
A1-Agave	35.85±2.45	0.393±0.005	76.88±0.99
A3-Agave	43.03±1.98	0.473±0.003	92.61±0.14
A5-Agave	41.77±2.01	0.482±0.007	94.29±0.35

Conclusiones. La sobreexpresión simultánea de las proteínas Adh1p y Hxt1p incrementó los rendimientos y la eficiencia fermentativa cuando las cepas recombinantes se cultivaron en medio YPD y medio con Agave.

Bibliografía.

1. Arrizon J, Gschaedler A (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Can J. Microbiol* 48:965–970.
2. Kruckeberg AL (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.*, 166:283–292.
3. Gritz L, Davies J (1983). Plasmid encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25:179–188.