

Fermentación de xilosa de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* mejorada a través de ingeniería evolutiva

Xylose fermentation of a *Saccharomyces cerevisiae* strain improved through evolutionary engineering

Carolina Ramírez-Soto*, Lina María López de Ávila**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v26n1.110533

RESUMEN

La ingeniería evolutiva busca el mejoramiento de microorganismos con aplicaciones industriales con el uso de técnicas que aceleran su adaptación a condiciones específicas. *Saccharomyces cerevisiae* tiene una capacidad biotecnológica superior; sin embargo, no es capaz de asimilar eficientemente pentosas provenientes de la biomasa lignocelulósica. En este trabajo, se aplicaron por separado tres metodologías de ingeniería evolutiva: Evolución Adaptativa en Laboratorio (EAL), mutagénesis y *genome shuffling*, en la cepa *S. cerevisiae* TMB3001. El consumo de xilosa de las cepas obtenidas fue muy superior al de la cepa parental TMB3001 (75% vs 5%) en condiciones aerobias y como única fuente de carbono. Cuando se evaluaron diferentes relaciones de xilosa y glucosa en condiciones anaerobias, se observó mayor crecimiento y consumo de los sustratos. El mayor rendimiento de biomasa se observó en la cepa A-300 (0,38 g/g) en una relación 75/25 de xilosa/glucosa. Todas las cepas mejoradas tuvieron un comportamiento fermentativo en glucosa que alcanzó rendimientos de etanol entre el 42 y 46%. En presencia de xilosa, los mayores rendimientos se alcanzaron en la relación 75/25 por las cepas A-300 y H-12 (38 y 40%, respectivamente). La combinación de técnicas de ingeniería evolutiva permitió la obtención de una levadura consumidora de xilosa con un fenotipo fermentativo muy prometedor para el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica.

Palabras clave: adaptación, fermentación, levadura, mutagénesis, pentosas.

ABSTRACT

Evolutionary engineering seeks the improvement of microorganisms with industrial applications, with the use of techniques that accelerate their adaptation to specific conditions. *Saccharomyces cerevisiae* has superior biotechnological capacity; however, it is not able to efficiently assimilate pentoses from lignocellulosic biomass. In this work, three evolutionary engineering methodologies were applied separately: adaptative laboratory evolution (ALE), mutagenesis, and genome shuffling, in the strain *S. cerevisiae* TMB3001. The xylose consumption of the improved strains was much higher than that of the parental strain TMB3001 (75% vs 5%) under aerobic conditions and xylose as only carbon source. When different ratios of xylose and glucose were evaluated under microaerophilic conditions, higher growth and consumption of substrates was observed. The highest biomass yield was observed in strain A-300 (0.38 g/g) with a ratio xylose/glucose of 75/25. All the improved strains had a fermentative behavior in glucose that reached ethanol yields between 42 and 46%. In presence of

* Microbióloga industrial y ambiental, MSc. Biología. Grupo Biotransformación, Universidad de Antioquia. Medellín, Antioquia, Colombia.

** Microbióloga y bioanalista, MSc. Biología. Grupo Biotransformación, Universidad de Antioquia. Medellín, Antioquia, Colombia. linam.lopez@udea.edu.co; ORCID 0000-0002-0099-6261

xylose, the highest yields were reached in 75/25 ratio by A-300 and H-12 strains (38 and 40%, respectively). The combination of techniques that increase genetic diversity and sequential adaptation in the laboratory allowed obtaining a xylose-consuming yeast with a very promising fermentative phenotype for the use of lignocellulosic biomass.

Key words: adaptation, fermentation, mutagenesis, pentoses, yeast

Recibido: octubre 8 de 2023 **Aprobado:** mayo 2 de 2024

INTRODUCCIÓN

Las consecuencias ambientales y el agotamiento de las fuentes de energía fósiles han dirigido muchas investigaciones en la búsqueda de fuentes alternativas sostenibles y económicas. La biomasa lignocelulósica es la materia orgánica más abundante del planeta y está siendo aprovechada por las biorrefinerías de segunda generación para la producción de biocombustibles como el bioetanol a gran escala (Broda *et al.*, 2022). Sin embargo, el aprovechamiento de la lignocelulosa presenta retos complejos por su composición química y recalcitrancia; este material está compuesto por lignina, un polímero fenólico que aporta soporte y rigidez; celulosa, un homopolímero de glucosa; y hemicelulosa, un heteropolímero compuesto principalmente por xilosa combinada con glucosa, manosa, galactosa y arabinosa (Singhvi *et al.*, 2019). La composición de estos azúcares depende en gran medida del tipo de biomasa, la xilosa es mucho más abundante en residuos del maíz, trigo y caña de azúcar (23-35%) que en maderas duras y otros residuos agrícolas (5-20%) (Ochoa *et al.*, 2022).

Siendo la xilosa el segundo azúcar más abundante después de la glucosa en la biomasa lignocelulósica, se convierte en un sustrato importante para su fermentación hasta etanol, aunque *Saccharomyces cerevisiae*, que es la levadura más utilizada en la fermentación de etanol no es capaz de asimilar eficientemente esta pentosa. Se han realizado numerosos intentos para capacitar a *S. cerevisiae* en el consumo de xilosa a través de ingeniería genética, con la introducción de genes heterólogos. El primer paso, es la expresión de la ruta de óxido reducción de *Scheffersomyces stipitis* (XYL1, xilosa reductasa-XR/ XYL2, xilitol deshidrogenasa-XDH) (Krahulec *et al.*, 2012; Matsushika *et al.*, 2011). También se ha empleado la ruta de asimilación de algunas bacterias anaerobias, que involucra la expresión de una enzima xilosa isomerasa (XI). La xilosa es convertida a xilulosa y esta puede ser metabolizada por *S. cerevisiae* a través de la ruta de las pentosas fosfato, aunque a una tasa muy baja (5-15%) por la baja capacidad de esta ruta no oxidativa (Johansson *et al.*, 2002). Para superar este punto crítico en el flujo metabólico, se ha sobreexpresado el gen endógeno *XKS*, que codifica la enzima xilulokinasa y convierte la xilulosa en xilulosa-5-fosfato para ser metabolizada hasta etanol. Sin

embargo, la demanda de ATP de esta ruta en condiciones limitadas de oxígeno puede causar inhibición significativa del crecimiento (Jin *et al.*, 2003). Estas modificaciones genéticas no se ven necesariamente reflejadas en un aumento en el consumo de xilosa y producción de etanol, principalmente por el desbalance redox que ocasiona una alta acumulación de xilitol y disminución en el rendimiento de etanol (Ruchala *et al.*, 2019).

El aprovechamiento de la xilosa por cepas modificadas de *S. cerevisiae* demuestra su intrincada red metabólica, que requiere de modificaciones globales en diferentes niveles del metabolismo celular. Las estrategias de ingeniería evolutiva inducen condiciones de presión selectiva para favorecer la selección de mutantes con características superiores. Se explota la plasticidad del genoma para lograr una reorganización del funcionamiento celular, logrando características fenotípicas más estables. Esta estrategia permite obtener poblaciones con capacidad de utilizar diversos sustratos, tolerancia a compuestos tóxicos y aumento en la productividad (Mavrommati *et al.*, 2022).

La Evolución Adaptativa en Laboratorio (EAL) es una estrategia basada en el principio de evolución natural, que se realiza en el laboratorio bajo condiciones especificadas para seleccionar la población con el mejor desempeño. Las células son cultivadas un periodo de tiempo hasta que una cepa mejorada con mutaciones benéficas aparece y domina la población (Mavrommati *et al.*, 2022). En el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica se han descrito múltiples cepas mejoradas a través de EAL, con mayor velocidad de crecimiento en xilosa, mayor tolerancia a compuestos como furfural y aldehídos y una mayor tasa fermentativa (Sarkar *et al.*, 2020; Trichez *et al.*, 2023). A través de estrategias evolutivas, se han mejorado cepas recombinantes que expresan alguna de las rutas de asimilación de xilosa (XR/XDH o XI), logrando mejores consumos de xilosa y producción de etanol. Estudios en cepas de *S. cerevisiae* que expresan XI demostraron que mutaciones no relacionadas directamente con el metabolismo de xilosa contribuyen en la utilización de esta pentosa. La EAL en un medio con xilosa en condiciones anaerobias ocasionó mutaciones en genes de la matriz mitocondrial o relacionados con la homeostasis de cationes que aumentan la disponibilidad del hierro y promueven el catabolismo de

la xilosa (Sato *et al.*, 2016). Metodologías como la fusión de protoplastos y la esporulación generan cambios y reconfiguración del genoma completo de las levaduras, la ploidía de las clonas obtenidas influye directamente en el desempeño de la población en una condición determinada. Xie *et al.*, (2020) demostraron que cepas recombinantes de *S. cerevisiae* luego de ser sometidas a esporulación y EAL exhibieron un comportamiento diferente en la utilización de los sustratos disponibles. La cepa diploide logró una tasa de consumo de xilosa 4.5 veces mayor mientras que la cepa haploide solo alcanzó un aumento de 2.6 veces en cultivos con xilosa y glucosa. Se ha reportado que cepas diploides presentan una mayor tolerancia a compuestos tóxicos presentes en hidrolizados lignocelulósicos y son más utilizadas en aplicaciones industriales (Lopes *et al.*, 2017).

En este estudio, se evaluó el comportamiento fermentativo en xilosa de una cepa recombinante de *S. cerevisiae* sometida a diferentes metodologías de ingeniería evolutiva, que incluyeron mutagénesis, *genome shuffling* y transferencias seriales y las clonas obtenidas de cada metodología fueron sometidas a EAL. Se llevaron a cabo cultivos de las cepas evolucionadas en condiciones anaerobias y con diferentes concentraciones de xilosa y glucosa para determinar la influencia de la estrategia de evolución en el consumo de xilosa. La combinación de estrategias que aumentan la diversidad genética de la cepa parental y seleccionan las poblaciones con mejor desempeño, permitió obtener una cepa fermentadora de xilosa capaz de superar el desbalance redox y analizar los posibles mecanismos celulares que subyacen a este fenotipo mejorado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos, medios y condiciones de cultivo. Todas las cepas utilizadas están descritas en la Tabla 1. Las cepas de *S. cerevisiae* desarrolladas en este estudio fueron derivadas de la cepa recombinante TMB3001 (Lund University, Suecia). Las levaduras fueron crecidas en medio YPX (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L y xilosa 20 g/L) y en medio YNB (Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos,

Sigma Aldrich) a 30°C y 120 rpm. Todas las cepas fueron conservadas a -80°C con 30% de glicerol.

Estrategias de ingeniería evolutiva. La cepa TMB3001 fue sometida a tres técnicas de ingeniería evolutiva para aumentar su diversidad genética: mutagénesis, transferencias seriales y *Genome Shuffling*. La mutagénesis se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Winston (2008), utilizando etilmetanosulfonato al 3% (EMS, Sigma Aldrich, EE. UU.) como agente inductor. Las células mutadas se sembraron en medio YPX y se incubaron a 30°C durante 4 días. Se recuperaron 30 colonias que fueron incubadas en medio YNB con 20 g/L de xilosa para determinar su consumo de xilosa. Las transferencias seriales se realizaron en medio YNB con 20 g/L de xilosa y 4 g/L de glucosa, las células fueron mantenidas a 30°C y 120 rpm hasta alcanzar su fase exponencial para ser transferidas a medio fresco, luego de las 150 generaciones, la concentración de glucosa en el medio se redujo a 1 g/L y se realizaron transferencias hasta alcanzar las 300 generaciones. Las células obtenidas fueron evaluadas para determinar el consumo de xilosa. Por último, la técnica de *genome shuffling* incluyó la fusión de protoplastos de las cepas de *S. cerevisiae* TMB3001 y GF16 y la cepa de *Sch. stipitis* ATCC® 58376. La formación de los protoplastos se realizó de acuerdo con Hou *et al.*, (2012) utilizando la enzima liti-casa (Sigma) (625 U/g células). La fusión de protoplastos se realizó de acuerdo con el método reportado por Yin *et al.*, (2016) con algunas modificaciones: se mezclaron los protoplastos de las tres cepas y separaron en dos fracciones. Una fracción fue sometida a radiación UV y la otra fue llevada a 60°C durante 30 min. Estas fracciones se mezclaron nuevamente y los protoplastos fueron resuspendidos en una solución de buffer fosfato con adición de PEG6000 40% y CaCl₂ 0.01 M, se llevó a incubación a 30°C durante 20 min. Posteriormente, se lavaron en NaCl 0.9% y se permitió la regeneración de la pared celular agar YPX con KCl 0.6 M y CaCl₂ 0.025 M a 30°C por 4 días. Se realizaron otras dos rondas sucesivas de fusión tomando como cepas parentales las

Tabla 1. Cepas evaluadas en este estudio.

Cepa	Características principales	Fuente/Referencia
<i>S. cerevisiae</i> TMB3001	<i>MATa his3- Δ1: YipXR/XDH/XK</i>	Eliasson <i>et al.</i> (2000)
H-12	Obtenida por <i>Genome Shuffling</i>	Grupo Biotransformación
M-2	Obtenida por mutagénesis	Este estudio
A-300	Obtenida por transferencias secuenciales	Este estudio
H-12A	H-12 adaptada	Este estudio
M-2A	M-2 adaptada	Este estudio
A-300A	A-300 adaptada	Este estudio

Tabla 2. Consumo de xilosa y crecimiento de las cepas evolucionadas en medio YNB.

Cepa	Biomasa (gL ⁻¹)	Xilosa (gL ⁻¹)	Rendimiento biomasa/sustrato (gg ⁻¹)
H-12A	7,23 ± 0,10	16,79 ± 1,04	0,43
M-2A	6,17 ± 0,08	14,24 ± 2,21	0,43
A-300A	5,21 ± 0,01	15,02 ± 1,65	0,34
TMB3001	0,09 ± 0,00	3,36 ± 1,01	0,02

clonas con mayor consumo de xilosa de la ronda de fusión anterior. Se evaluaron las cepas obtenidas de las rondas 2 y 3 para determinar su consumo de xilosa. Todas las cepas obtenidas fueron crioconservadas a -80°C con glicerol al 30%.

Evolución adaptativa en laboratorio (EAL). Se sometieron a esta evolución las cepas obtenidas de cada uno de los métodos descritos anteriormente y se incluyó la cepa TMB3001 como control. La técnica EAL consistió en una adaptación a largo plazo en medio YNB con 20 g/L de xilosa, las células fueron inoculadas y se mantuvieron en el mismo medio de cultivo durante 7 días a 30°C y 120 rpm. Luego de esta incubación, las células fueron sembradas en agar YNB (20 g/L xilosa) a 30°C durante 48 horas. Las colonias obtenidas fueron crioconservadas a -80°C con glicerol al 30%. Para determinar el comportamiento de las cepas evolucionadas en condiciones aerobias, se sembraron en medio YNB (20 g/L de xilosa) y se determinó la biomasa y consumo de xilosa.

Evaluación del comportamiento fermentativo. Para determinar la capacidad fermentativa y osmotolerancia de las cepas evolucionadas, se prepararon medios YNB con 100 g/L de sustratos totales en diferentes relaciones de xilosa y glucosa (0:100, 25:75, 40:60, 50:50, 75:25, respectivamente). El preinoculo de cada levadura fue cultivado a 30°C durante 16 horas. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 120 rpm durante 120 horas, en condiciones micro aerofilicas usando tapón de caucho y salida de CO₂. Se tomaron muestras cada 6 horas hasta las 24 horas de incubación y luego cada 24 horas hasta las 120 horas, se cuantificó la producción de biomasa, consumo de sustratos y formación de productos. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Métodos analíticos. La densidad óptica de los cultivos fue determinada a 600 nm usando un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 2PC, Suecia) y la biomasa celular se determinó por peso seco. Glucosa, xilosa, xilitol, etanol y glicerol fueron cuantificados por HPLC (1200 series Agilent Technologies, EE. UU.) usando una columna Aminex HPX

87-H (BioRad, EE. UU.) y un detector de índice de refracción. La fase móvil fue ácido sulfúrico 4 mM y la corrida se llevó a cabo a 50°C con un flujo de 0,6 ml/min.

Análisis estadístico. Los resultados de las fermentaciones fueron analizados utilizando un análisis de varianza factorial (ANOVA), previa construcción de modelos lineales, usando la función *lm* del paquete *stats* en el software R 3.2.5 (R Core Team, 2016). Cuando hubo diferencias significativas en el ANOVA, se realizó una prueba de comparaciones múltiples (comparación de variables entre cepas y entre relaciones), mediante la prueba HSD (*Honestly-significant-difference*) de Tukey usando el paquete *agricolae*. Todas las inferencias se realizaron con una significancia (α) de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

S. cerevisiae se ha convertido en una fábrica celular para la producción de innumerables compuestos a escala industrial. El aprovechamiento de todas las fuentes de carbono disponibles para su conversión a productos de valor agregado ha llevado a explorar estrategias que capaciten a *S. cerevisiae* en la utilización eficiente de las pentosas provenientes de la biomasa lignocelulósica. La introducción de genes heterólogos que codifican enzimas capaces de convertir la xilosa en xilulosa, para ser asimilada a través de la ruta de las pentosas fosfato; ha permitido la obtención de cepas fermentadoras de esta pentosa. En la cepa recombinante TMB3001, que expresa los genes *XYL1* y *XYL2* de *Sch. stipitis*, la asimilación de xilosa aportó la energía suficiente para soportar el crecimiento solo en condiciones aerobias (Eliasson *et al.*, 2000). Otros estudios revelaron la complejidad del metabolismo de xilosa, que no es controlado solo por la expresión de las enzimas directamente relacionadas con su conversión (XR/XDH), sino que requiere mayor eficiencia en su ingreso al metabolismo central de carbono, desde la afinidad de los transportadores transmembranales hasta su paso a través de la ruta no oxidativa de las pentosas fosfato (Karhumaa *et al.*, 2007).

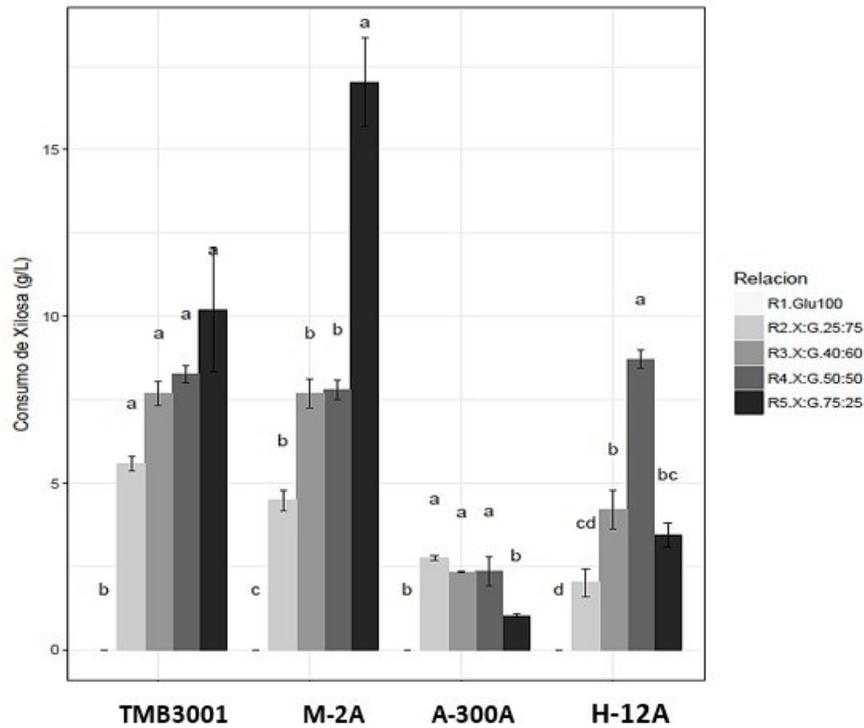


Figura 1. Consumo de xilosa de las cepas adaptadas en diferentes relaciones de xilosa y glucosa.

En este estudio, la cepa TMB 3001 se utilizó como cepa parental para la aplicación de diferentes estrategias de ingeniería evolutiva. Se determinó el consumo de xilosa de las cepas mejoradas, evidenciando que la cepa H-12, obtenida luego de tres rondas de fusión de protoplastos, alcanzó el mayor consumo de xilosa en condiciones aerobias en medio YNB (21,7 %) respecto a las cepas M-2, A-300 y la parental TMB 3001 (15,8%, 10,3% y 8,2%, respectivamente). El consumo de xilosa en estos cultivos se dio principalmente a través de un metabolismo respiratorio, que direccionó todo el carbono a la formación de biomasa y no se detectaron valores de etanol o glicerol.

Posteriormente, las cepas H-12, M-2 y A-300 fueron sometidas a EAL en un medio definido (YNB) con 20 g/L de xilosa como única fuente de carbono durante 7 días. La población de células evolucionadas al final de cada cultivo fue recuperada en medio sólido y se denominaron H-12A, M-2A y A-300A. El consumo de xilosa de las cepas evolucionadas en condiciones aerobias estuvo entre 4,4 y 5,0 veces mayor que la cepa parental, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las tres cepas evolucionadas. El rendimiento de biomasa fue significativamente mayor en las cepas H-12A, M-2A y A-300A que en la cepa parental en 120 horas de cultivo ($P < 0.05$) (Tabla 2). Esta mejora en la capacidad de utilizar xilosa en las cepas adaptadas a través de estrategias de ingeniería evolutiva se relaciona con la diversidad genómica que acumula cada cepa. Cepas recombinantes que expresan genes heterólogos para la asimilación de xilosa, también exhibieron aumento en el consumo de xilosa después de la aplicación de un

protocolo de evolución, logrando consumir el 83,5% de xilosa en el medio (Coimbra *et al.*, 2023). Todas las cepas evolucionadas exhibieron un fenotipo consumidor de xilosa superior al de la cepa recombinante, demostrando que la estrategia de evolución modulada por condiciones de cultivo en el laboratorio permite la adaptación eficiente de células con una amplia diversidad genómica a una condición selectiva. Estudios sobre el efecto de las mutaciones adaptativas en el fenotipo, sugieren que independiente de la diversidad genética de las células, la adaptación a una condición específica es predecible y repetible porque las mutaciones que se acumulan durante la adaptación se comportan de forma modular afectando los mismos genes y las mismas vías (Kinsler *et al.*, 2020).

Las cepas evolucionadas fueron crecidas en condiciones anaerobias en medio YNB con diferentes concentraciones de glucosa y xilosa. En todas las condiciones, las cepas consumieron totalmente la glucosa presente en el medio de cultivo a las 120 horas de incubación. El máximo consumo de xilosa se evidenció con la cepa M-2A en la relación 75:25, consumiendo 67% más que la cepa TMB3001 en la misma relación de azúcares ($P < 0,05$). La cepa A-300A presentó el menor consumo de xilosa en todas las relaciones evaluadas, alcanzando un consumo máximo de 5,3 g/L en la relación 40:60; la cepa H-12A consumió menos xilosa que la cepa TMB3001 (Figura 1). La glucosa ejerce una fuerte represión catabólica que disminuye considerablemente la asimilación de otras fuentes de carbono; adicionalmente, la afinidad de los transportadores de la familia HXT (principalmente Hxt5 y Hxt7) es muy baja para xilosa

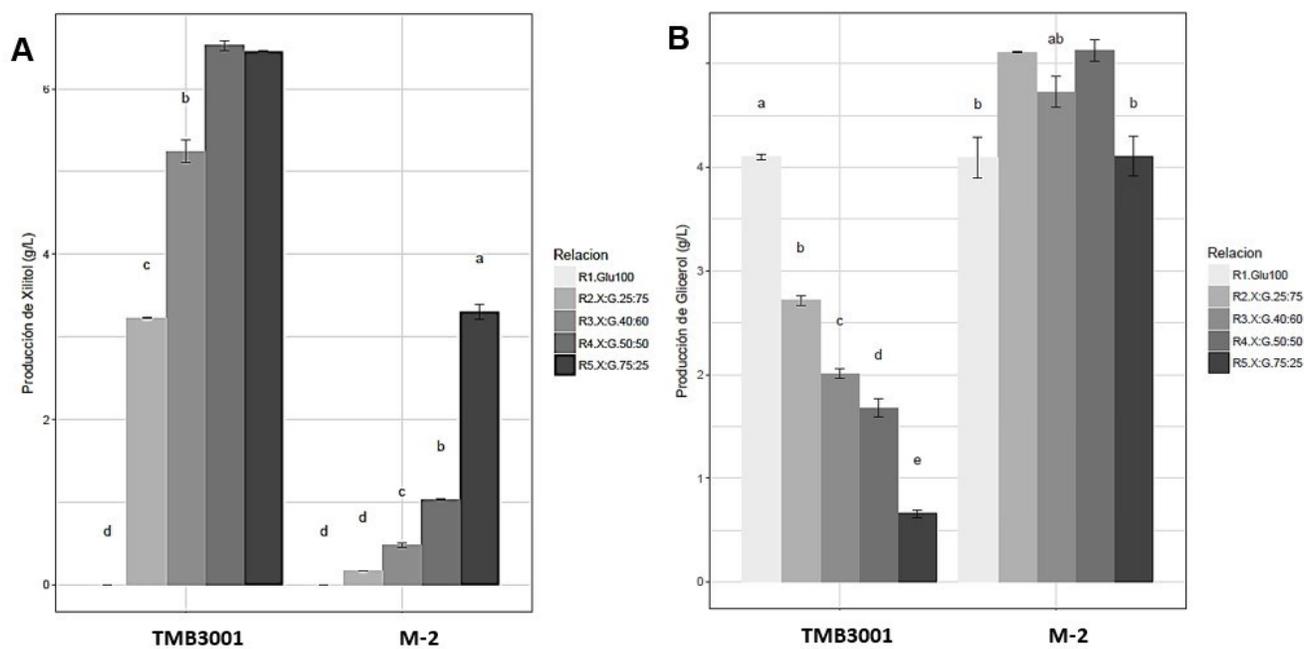


Figura 2. Acumulación de (A) xilitol y (B) glicerol de la cepa TMB3001 y la cepa M-2 en diferentes relaciones de xilosa y glucosa.

con Km entre 0,1mM y 1,5 M, comparado con la afinidad por la glucosa (10 μ M - 100 mM); y depende de la concentración de glucosa y xilosa en el medio (Ochoa *et al.*, 2022). En todas las cepas evolucionadas, la glucosa fue el sustrato preferencial y su concentración determinó la capacidad de las levaduras de consumir la xilosa presente en el medio. En los ensayos en los que la glucosa estuvo en menor concentración, esta se agotó rápidamente haciendo que la biomasa formada consumiera mayor cantidad de xilosa. Este comportamiento se evidenció en la cepa recombinante TMB3001 y la cepa evolucionada M-2A, con un aumento significativo en el consumo de la cepa obtenida por ingeniería evolutiva (Figura 1).

El comportamiento fermentativo de la cepa M-2 con respecto a la cepa TMB3001 fue significativamente diferente, demostrando una respuesta metabólica diferencial relacionada con el consumo de xilosa. El glicerol y xilitol son metabolitos que pueden acumularse a partir de la fermentación de glucosa y xilosa y disminuyen el rendimiento de etanol como producto principal. La cepa TMB3001 acumuló entre 3,23 y 6,45 g/L de xilitol en los cultivos con 25 hasta 75 g/L de xilosa, respectivamente (Figura 2A). La cepa M-2 acumuló entre un 95 y 49% menos xilitol que la cepa recombinante, demostrando un alivio en el desbalance de cofactores de las enzimas XR y XDH. Una de las principales razones de la acumulación de xilitol es el desbalance de oxidoreducción entre XR y XDH, que se da porque XR usa preferentemente NADPH, en la reducción de xilosa a xilitol y XDH usa exclusivamente NAD⁺ en la oxidación de xilitol a xilulosa (Khattab *et al.*, 2013).

La acumulación de glicerol también demuestra diferencias en la respuesta metabólica a la asimilación de xilosa. La cepa TMB3001 produjo más glicerol en los cultivos con mayor cantidad de glucosa; sin embargo, la cepa M-2 produjo 88% más glicerol en los medios con xilosa ($P < 0,05$). En presencia de glucosa, la producción de glicerol permite la regeneración de NADPH y NAD⁺, disminuyendo la acumulación de xilitol al ser oxidado hasta xilulosa. Cuando la glucosa se agota, la producción de glicerol no puede mantenerse, esto hace que la oxidación de xilitol se ralentice y comience a acumularse (Westman *et al.*, 2014). La producción de glicerol en la cepa TMB3001 fue directamente proporcional a la cantidad de glucosa del medio, y se observó que la acumulación de xilitol fue mayor en los medios con menor contenido de glucosa y menor producción de glicerol. El comportamiento de la cepa M-2 fue diferente, la producción de glicerol fue mayor en todos los medios y el rendimiento fue aumentando conforme aumentó la concentración de xilosa, aunque la producción de glicerol se dio exclusivamente a expensas de la glucosa. Este exceso de glicerol alivió el desbalance de cofactores y contribuyó al aumento de consumo de xilosa y menor acumulación de xilitol en esta cepa. A medida que aumentaba la concentración de xilosa en el medio, la glucosa es redirigida hacia glicerol para mantener activas las enzimas involucradas en la oxidoreducción de la xilosa (Tabla 3).

La producción de etanol en ambas cepas se relacionó directamente con la concentración de glucosa consumida, siendo mayor en los cultivos con mayor concentración de glucosa; sin embargo, en la relación 75:25 en la que ambas cepas tuvieron su máximo consumo de xilo-

Tabla 3. Rendimientos de biomasa, etanol, glicerol y xilitol en diferentes concentraciones de xilosa y glucosa.

Xil:Glu	Y etanol/sustrato (gg ⁻¹)		Y biomasa/sustrato (gg ⁻¹)		Y glicerol/sustrato (gg ⁻¹)		Y xilitol/sustrato (gg ⁻¹)	
	TMB3001	M-2	TMB3001	M-2	TMB3001	M-2	TMB3001	M-2
0:100	0,43	0,46	0,11	0,10	0,04	0,04	ND	ND
25:75	0,41	0,42	0,14	0,12	0,03	0,06	0,58	0,04
40:60	0,39	0,39	0,16	0,15	0,03	0,07	0,68	0,06
50:50	0,37	0,40	0,17	0,16	0,03	0,09	0,79	0,13
75:25	0,30	0,30	0,23	0,19	0,02	0,10	0,65	0,20

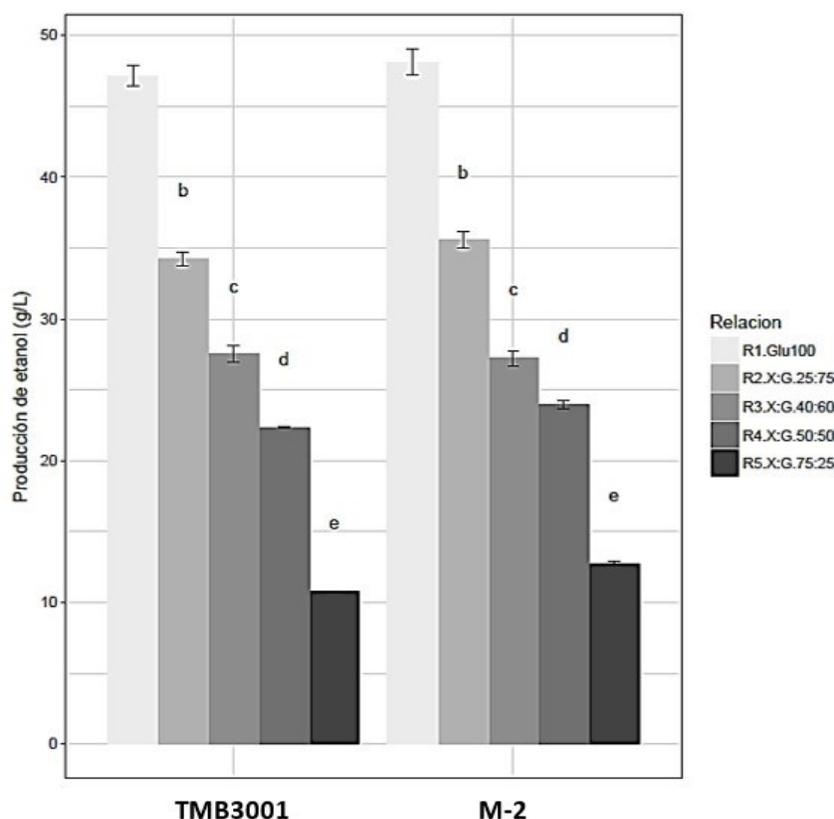


Figura 3. Producción de etanol de la cepa TMB3001 y la cepa M-2 en diferentes relaciones de xilosa y glucosa.

sa, la cepa M-2 produjo 18% más etanol ($P < 0,05$) (Figura 3). El consumo de sustratos en los cultivos con mayor cantidad de glucosa se realizó principalmente a través de la vía fermentativa, alcanzando mayores rendimientos de etanol. En los cultivos con mayor cantidad de xilosa, el metabolismo fue respirofermentativo con mayores rendimientos de biomasa y acumulación de subproductos como xilitol y glicerol (Tabla 3).

La producción de etanol a partir de glucosa produce 2 ATP netos y es neutra en términos de oxido reducción: la enzima Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa oxida el gliceraldehido-3-P a 1-3 difosfoglicerato, reduciendo NAD^+ a $NADH$; y posteriormente en la misma vía la enzima alcohol deshidrogenasa reduce acetaldehído a etanol, reoxidando $NADH$ a NAD^+ (Pfeiffer *et al.*, 2014). Sin embargo, a partir de xilosa sólo se producen 1,66 ATP por molécula de xilosa y hay un desbalance en los

cofactores, ya que la enzima XR es dependiente de NADPH y la enzima XDH es dependiente de NAD⁺. Esto conlleva a que la producción de etanol a partir de xilosa sea desfavorable para el metabolismo global de la levadura. En este caso, las dos levaduras evaluadas fermentaron la glucosa y utilizaron la xilosa para formación de biomasa. Las modificaciones de la cepa M-2 no afectaron su capacidad fermentativa; en cambio, reorganizaron la respuesta metabólica a la asimilación de xilosa. Lee et al., (2021) identificaron modificaciones genéticas que favorecen la fermentación aerobia de xilosa; involucrando mutaciones en los genes *HOG1*, *ISU1* e *IRA2*, que favorecen las vías regulatorias PKA y *Snf1*. Esta combinación inusual de sistemas regulatorios permitiría que la célula active su metabolismo fermentativo en xilosa con un flujo metabólico alto. Otros estudios han demostrado el efecto de HOG en la utilización de xilosa, como un nodo regulatorio importante (Qiu et al., 2023).

La ruta metabólica de producción de glicerol ha demostrado un papel importante en el control y el balance del metabolismo celular. El glicerol es el principal soluto compatible utilizado por las levaduras. Bajo condiciones de estrés hiperosmótico se incrementa la síntesis de glicerol en las células. También lo producen para mantener el balance de oxidoreducción y en respuesta a estrés oxidativo (Saxena et al., 2016). De acuerdo con los resultados de este estudio, la cepa M-2 fue capaz de detectar la xilosa como una fuente de carbono fermentable y activó la ruta de producción de glicerol en respuesta a estrés oxidativo, para tratar de mantener el balance de oxido-reducción de la célula.

CONCLUSIÓN

La combinación de mutagénesis y adaptación permitió la reorganización metabólica de la cepa TMB3001 para asimilar eficientemente xilosa como fuente de carbono. La cepa evolucionada M-2A exhibió mayor consumo de xilosa, a través de un metabolismo respiratorio fermentativo en el que se disminuyó considerablemente la acumulación de xilitol y se compensó el desbalance de cofactores utilizando la ruta de producción de glicerol. La capacidad fermentativa de la cepa evolucionada no disminuyó y alcanzó rendimientos de etanol similares a la cepa parental TMB3001. Las estrategias de ingeniería evolutiva se convierten en una herramienta valiosa en el mejoramiento de cepas con potencial industrial, generando cambios que superan las restricciones metabólicas globales de la célula.

BIBLIOGRAFÍA

Broda, M., Yelle, D. J., & Serwańska, K. (2022). Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass-

- Challenges and Solutions. *Molecules*, 27(24). <https://doi.org/10.3390/molecules27248717>
- Coimbra, L., Malan, K., Fagúndez, A., Guigou, M., Lareo, C., Fernández, B., . . . Batista, S. (2023). Fermentation of D-xylose to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 Recombinant Strains. *BioEnergy Research*, 16(2), 1001-1012. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10514-1>
- Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C. F., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol*, 66(8), 3381-3386. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3381-3386.2000>
- Hou, X., & Yao, S. (2012). Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93(6), 2591-2601. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3693-5>
- Jin, Y. S., Ni, H., Laplaza, J. M., & Jeffries, T. W. (2003). Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. *Appl Environ Microbiol*, 69(1), 495-503. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.495-503.2003>
- Johansson, B., & Hahn-Hägerdal, B. (2002). The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001. *FEMS Yeast Res*, 2(3), 277-282. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00095.x>
- Karhumaa, K., Fromanger, R., Hahn-Hägerdal, B., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73(5), 1039-1046. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0575-3>
- Khattab, S. M., Saimura, M., & Kodaki, T. (2013). Boost in bioethanol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with mutated strictly NADPH-dependent xylose reductase and NADP(+)-dependent xylitol dehydrogenase. *J Biotechnol*, 165(3-4), 153-156. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.03.009>
- Kinsler, G., Geiler-Samerotte, K., & Petrov, D. A. (2020). Fitness variation across subtle environmental perturbations reveals local modularity and global pleiotropy of adaptation. *Elife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.61271>
- Krahulec, S., Klimacek, M., & Nidetzky, B. (2012). Analysis and prediction of the physiological effects of altered coenzyme specificity in xylose reductase and xylitol dehydrogenase during xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 158(4), 192-202. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.08.026>

- Lee, S. B., Tremaine, M., Place, M., Liu, L., Pier, A., Krause, D. J., . . . Sato, T. K. (2021). Crabtree/Warburg-like aerobic xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 68, 119-130. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.09.008>
- Lopes, D. D., Rosa, C. A., Hector, R. E., Dien, B. S., Mertens, J. A., & Ayub, M. A. Z. (2017). Influence of genetic background of engineered xylose-fermenting industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 44(11), 1575-1588. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1979-z>
- Matsushika, A., & Sawayama, S. (2011). Comparative study on a series of recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains with different expression levels of xylose reductase and xylulokinase. *Enzyme Microb Technol*, 48(6-7), 466-471. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.02.002>
- Mavrommati, M., Daskalaki, A., Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2022). Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology. *Biotechnol Adv*, 54, 107795. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107795>
- Ochoa-Chacón, A., Martínez, A., Poggi-Varaldo, H. M., Villa-Tanaca, L., Ramos-Valdivia, A. C., & Ponce-Noyola, T. (2022). Xylose Metabolism in Bioethanol Production: *Saccharomyces cerevisiae* vs Non-*Saccharomyces* Yeasts. *BioEnergy Research*, 15(2), 905-923. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10340-x>
- Pfeiffer, T., & Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front Mol Biosci*, 1, 17. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>
- Qiu, Y., Wu, M., Bao, H., Liu, W., & Shen, Y. (2023). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for co-fermentation of glucose and xylose: Current state and perspectives. *Engineering Microbiology*, 3(3), 100084. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.engmic.2023.100084>
- Ruchala, J., Kurylenko, O. O., Dmytruk, K. V., & Sibirny, A. A. (2020). Construction of advanced producers of first and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). *J Ind Microbiol Biotechnol*, 47(1), 109-132. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02242-x>
- Sarkar, P., Mukherjee, M., Goswami, G., & Das, D. (2020). Adaptive laboratory evolution induced novel mutations in *Zymomonas mobilis* ATCC ZW658: a potential platform for co-utilization of glucose and xylose. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 47(3), 329-341. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02270-y>
- Sato, T. K., Tremaine, M., Parreiras, L. S., Hebert, A. S., Myers, K. S., Higbee, A. J., . . . Landick, R. (2016). Directed Evolution Reveals Unexpected Epistatic Interactions That Alter Metabolic Regulation and Enable Anaerobic Xylose Use by *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*, 12(10), e1006372. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006372>
- Saxena, A., & Sitaraman, R. (2016). Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae* via mechanisms other than the high-osmolarity glycerol pathway. *Microbiology (Reading)*, 162(9), 1511-1526. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000360>
- Singhvi, M. S., & Gokhale, D. V. (2019). Lignocellulosic biomass: Hurdles and challenges in its valorization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(23-24), 9305-9320. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10212-7>
- Trichez, D., Steindorff, A. S., de Moraes Júnior, W. G., Vilela, N., Bergmann, J. C., Formighieri, E. F., . . . de Almeida, J. R. M. (2023). Identification of traits to improve co-assimilation of glucose and xylose by adaptive evolution of *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis* yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 107(4), 1143-1157. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12362-1>
- Westman, J. O., Bonander, N., Taherzadeh, M. J., & Franzén, C. J. (2014). Improved sugar co-utilisation by encapsulation of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in alginate-chitosan capsules. *Biotechnol Biofuels*, 7, 102. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-102>
- Winston, F. (2008). EMS and UV mutagenesis in yeast. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 13, Unit 13.13B. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1303bs82>
- Yang, B. X., Xie, C. Y., Xia, Z. Y., Wu, Y. J., Gou, M., & Tang, Y. Q. (2020). Improving xylitol yield by deletion of endogenous xylitol-assimilating genes: a study of industrial *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation of glucose and xylose. *FEMS Yeast Res*, 20(8). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa061>
- Yin, H., Ma, Y., Deng, Y., Xu, Z., Liu, J., Zhao, J., . . . Chang, Z. (2016). Genome shuffling of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced glutathione yield and relative gene expression analysis using fluorescent quantitation reverse transcription polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods*, 127, 188-192. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.012>