

**CONSTRUCCIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE BIBLIOTECAS GENÓMICAS PARA
IDENTIFICAR GENES DE *LACTOBACILLUS BREVIS* INVOLUCRADOS EN LA
TOLERANCIA AL N-BUTANOL**

JORGE LUIS RICO REYES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

**CONSTRUCCIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE BIBLIOTECAS GENÓMICAS PARA
IDENTIFICAR GENES DE *LACTOBACILLUS BREVIS* INVOLUCRADOS EN LA
TOLERANCIA AL N-BUTANOL**

JORGE LUIS RICO REYES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Químico

Director:

Viviana Sánchez Torres
Ingeniera Química Ph. D

Codirectores:

Katy Kao C
Ingeniera Química Ph. D

Yuqi Guo

Ingeniera Biológica Ph. D C

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

DEDICATORIA

Este trabajo fue realizado durante una pasantía de investigación en *Texas A&M University* superando muchos retos y dificultades, quiero dedicar este trabajo principalmente a Dios por ser una fuerza incondicional de apoyo y motivación, a mis padres por todo su esfuerzo y apoyo, a mi familia por estar siempre presentes, a mis amigos (Nati, Cali, Roberto, Jose y Mimis) por hacer de estos años universitarios una experiencia inolvidable, a mis amigos Camilo Rivero y Camilo Marconi porque sé que siempre han estado allí y siempre lo estarán y finalmente a todas aquellas personas amantes del conocimiento y sedientas de una Colombia más justa y próspera.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Katy Kao por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y ser un apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

A la candidata a Ph.D Yuqi Guo por enseñarme a utilizar los equipos del laboratorio y ser una guía fundamental en este trabajo.

A la Dra. Viviana Sánchez por sus conocimientos, su dedicación y valiosos aportes en la revisión de este libro.

Al grupo de investigación Katy Kao del *Artie Mcferrin Department of Chemical Engineering* (College Station, TX, USA) por toda su colaboración y apoyo.

A la Universidad Industrial de Santander por la formación que me brindó y a todos mis maestros por sus conocimientos compartidos.

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	12
OBJETIVOS	15
1. MARCO TEÓRICO.....	16
1.1 CONCEPTOS Y HERRAMIENTAS BÁSICAS DE CLONACIÓN MOLECULAR	16
1.1.1 <i>Escherichia coli</i>	16
1.1.2 Plásmidos.....	16
1.1.3 Enzimas de restricción	17
1.1.4 Reacción de polimerasa en cadena (PCR)	17
1.1.5 Pasos clave en clonación molecular	18
1.2 BIBLIOTECAS GENÓMICAS	19
1.2.1 Que es una biblioteca genómica?	19
1.2.2 Para qué sirven las bibliotecas genómicas?.....	20
1.2.3 Cobertura de una biblioteca genómica	20
1.2.4 Enriquecimiento de una biblioteca genómica	21
1.3 SECUENCIAS GENÓMICAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> Y <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i>	21
1.4 MECANISMOS MOLECULARES CONOCIDOS INVOLUCRADOS EN LA TOLERANCIA AL N-BUTANOL	22
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	23
2.1 CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA.....	25
2.2 ENRIQUECIMIENTO DE LAS BIBLIOTECAS	27
2.3 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS	29
3. RESULTADOS	30
3.1 CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA.....	30
3.1.1 Sonicación y extracción de fragmentos en gel de agarosa	30
3.1.2 Clonación de fragmentos y transformaciones	31
3.2 ENRIQUECIMIENTO DE LAS BIBLIOTECAS	33

3.3 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS	36
4. CONCLUSIONES.....	39
5. RECOMENDACIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
CITAS BIBLIORGRÁFICAS.....	43
ANEXOS	48

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Mecanismo de corte enzimas de restricción.....	17
Figura 2. Mapa circular del plásmido pYG2, con sus partes más relevantes.	24
Figura 3. Desarrollo experimental.....	24
Figura 4. Construcción biblioteca genómica.	26
Figura 5. Estrategia de enriquecimientos	28
Figura 6. Representación gráfica de las réplicas inoculadas para los enriquecimientos realizados.....	28
Figura 7. Sonicación y extracción de fragmentos de ADN en gel de agarosa.....	30
Figura 8. Fotografía muestra de algunas de las transformaciones realizadas.	32
Figura 9. Verificación por PCR de colonia.....	33
Figura 10. Fotografía población enriquecida:	34
Figura 11. Visualización gráfica de los enriquecimientos realizados y la verificación por PCR de colonia de cada muestra aislada.	35
Figura 12. Orientación del fragmento secuenciado con respecto al promotor LacO1 en el plásmido pYG2.	37
Figura 13. Guía 2 Log-ladder.....	53

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
ANEXO A. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.....	48
ANEXO B. PROTOCOLOS UTILIZADOS EN LA CONSTRUCCIÓN DE LAS BIBLIOTECAS GENÓMICAS.....	49
ANEXO C. PCR DE COLONIA.....	52
ANEXO D. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA Y LA GUÍA 2-LOG LADDER.....	53
ANEXO E. FOTOGRAFIAS PRINCIPALES EQUIPOS UTILIZADOS.....	54

RESUMEN

TITULO: CONSTRUCCIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE BIBLIOTECAS GENÓMICAS PARA IDENTIFICAR GENES DE *LACTOBACILLUS BREVIS* INVOLUCRADOS EN LA TOLERANCIA AL N-BUTANOL.*

AUTOR: JORGE LUIS RICO REYES.**

PALABRAS CLAVE: Biblioteca genómica, n-butanol, tolerancia, *Lactobacillus brevis*, *Escherichia coli*.

DESCRIPCIÓN

El n-butanol es un biocombustible emergente y prometedor. Recientes trabajos de ingeniería metabólica han demostrado la posibilidad de utilizar varios microorganismos para la producción de este compuesto. Sin embargo, uno de los desafíos presentes en la bioproducción de n-butanol es la baja tolerancia que presentan las cepas productoras, frente al n-butanol y otros inhibidores, lo cual implicaría bajos rendimientos y altos costos de separación en la producción industrial. *Lactobacillus brevis* es altamente tolerante al n-butanol y algunos inhibidores presentes en materias primas renovables de bajo costo (hidrolizados lignocelulósicos). No obstante, este microorganismo es difícil de manipular genéticamente y exige altos requerimientos nutricionales, lo cual podría limitar las posibilidades de alcanzar una producción rentable. Una de las alternativas de solución para mejorar la bioproducción de n-butanol es identificar los mecanismos moleculares involucrados en los fenotipos de interés exhibidos por *L. brevis* y utilizarlos en la ingeniería de un microorganismo versátil y fácil de manipular como *Escherichia coli*.

En el presente trabajo se construyó una biblioteca genómica de *L. brevis* ATCC 367 expresada en *E. coli* BW25113 útil para identificar genes involucrados en fenotipos de cualquier interés. La biblioteca fue sometida a una serie de enriquecimientos en donde se identificó que posiblemente la expresión de un fragmento del genoma *L. brevis* cuya mayor parte corresponde a la secuencia del gen LVIS_1713 que codifica la acetiltransferasa, puede mejorar la tolerancia al n-butanol en *E. coli*. Este trabajo es un aporte para el conocimiento de los genes involucrados en la resistencia al n-butanol y el desarrollo de herramientas moleculares en la ingeniería de microorganismos con aplicaciones industriales.

* Trabajo de grado, Pasantía de investigación.

** Facultad de ingenierías Físico-Químicas, Escuela de Ingeniería Química, Director: Ph. D Viviana Sánchez Torres. Codirectores: Ph.D Katy Kao y Ph. D C Yuqi Guo.

ABSTRACT

TITLE: CONSTRUCTION AND ENRICHMENT OF GENOMIC LIBRARIES FOR IDENTIFYING *LACTOBACILLUS BREVIS* GENES INVOLVED IN N-BUTANOL TOLERANCE.*

AUTHOR: JORGE LUIS RICO REYES.**

KEY WORDS: Genomic Library, n-butanol, tolerance, *Lactobacillus brevis*, *Escherichia coli*.

DESCRIPTION:

n-Butanol is an emerging and promising biofuel. Recent metabolic engineering studies have shown the possibility of using several microorganisms for the production of this chemical. However, these studies highlight that one of the challenges present in the bioproduction of n-butanol, is the low tolerance of the microbial hosts to n-butanol and other inhibitors, leading to low production yields and high separation costs at industrial scale. *Lactobacillus brevis* is highly tolerant to n-butanol and other inhibitors present in low cost renewable feedstock (lignocellulosic hydrolysates). However, this microorganism is difficult to manipulate and need high nutritional requirements, which could limit the opportunities to achieve a profitable production. An alternative solution for improving the bioproduction of n-butanol is to identify the molecular mechanisms involved in the phenotypes of interest exhibited by *L. brevis* and use them in the engineering of the well-studied *Escherichia coli*.

In this work, it was constructed a genomic DNA library of *L. brevis* ATCC 367 expressed in *E. coli* BW25113, useful to identify genes involved in different phenotypes of interest. The library was subjected to a serial enrichment strategy. It was found that the expression in *E. coli* of a genomic fragment that included most of the *L. brevis* gene LVIS_1713 which encodes the acetyltransferase, could improve n-butanol tolerance. This work is a contribution to the knowledge of the genes involved in n-butanol tolerance and the development of molecular tools in the engineering of microorganisms for industrial applications.

* Bachelor thesis, Research internship.

**Physical-Chemical Engineering Faculty, Chemical Engineering School, Director: Ph D. Viviana Sánchez Torres. Codirectors: Ph D. Katy Kao and Ph D. C Yuqi Guo.

INTRODUCCIÓN

La biomasa es una fuente de energía renovable que recientemente ha despertado gran interés a nivel mundial [1], actualmente grandes cantidades son transformadas biológicamente en etanol para su uso como combustible [2], sin embargo, este compuesto ha demostrado no ser un perfecto sustituto de la gasolina comercial ya que es un compuesto volátil, con bajo poder calorífico y alto contenido de agua. Por otro lado, el n-butanol es un compuesto hidrófobo con alto poder calorífico, su presión de vapor (4 mmHg 4 °C) es ~11 veces menor que la del etanol (45 mmHg 20 °C), es relativamente fácil de transportar y puede ser utilizado en motores sin ninguna modificación ya sea como sustituto o suplemento de la gasolina comercial [3].

La producción biológica de n-butanol se conoce como fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol) este proceso es realizado por varias bacterias del género *Clostridium* particularmente la especie *acetobutylicum* (productor nativo). En la fermentación realizada por *C. acetobutylicum* también se generan subproductos indeseados (butirato, acetona y etanol) que dificultan alcanzar altos rendimientos de n-butanol [4,5]. Por esta razón, recientes trabajos de ingeniería metabólica han explorado la posibilidad de producir n-butanol en microorganismos versátiles y fáciles de manipular como la *Escherichia coli* [6,7]. Particularmente, se ha reconstruido la ruta metabólica de *C. acetobutylicum* para la producción de n-butanol en *E. coli* [7]; en este trabajo se demuestra que es posible aumentar la producción mediante la eliminación y sobreexpresión de algunos de los genes involucrados en la ruta metabólica, sin embargo, se resalta que uno de los desafíos presentes que limita la rentabilidad económica en la bioproducción a gran escala, es la baja tolerancia que muestran las cepas utilizadas frente a las concentraciones del n-butanol producido (1.5 % v/v) y algunos inhibidores presentes en las materias primas utilizadas.

La tolerancia al n-butanol es un fenotipo complejo que involucra múltiples interacciones producto de la expresión de diferentes genes, desafortunadamente no hay un amplio conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta de los microorganismos frente a este inhibidor, lo cual ha limitado las posibilidades de desarrollar cepas altamente resistentes [34].

Las bacterias ácido-lácticas pertenecen a un amplio grupo de bacterias gram-positivas tradicionalmente utilizadas en la producción de alimentos fermentados [8]. *Lactobacillus brevis* (miembro de esta familia) ha reportado ser altamente tolerante al n-butanol (3 % v/v) [9] y otros compuestos (ácido ferúlico y furfural) presentes en materias primas renovables de bajo costo (material lignocelulósico) [10], además cuenta con la maquinaria necesaria para metabolizar las pentosas y hexosas presentes en la biomasa celulósica [11]. Previamente, se reconstruyó la ruta metabólica de *C. acetobutylicum* para producir n-butanol en *L. brevis* [12]. Esta cepa modificada es un candidato potencial para utilizar en la bioproducción a gran escala de n-butanol. No obstante, este organismo carece de algunos genes involucrados en la síntesis de aminoácidos [13,14], esto hace que *L. brevis* exija altos requerimientos nutricionales, lo que se traduce en altos costos de producción. Una de las alternativas de solución a este problema sería la ingeniería de *L. brevis* con el fin de reducir sus requerimientos nutricionales, sin embargo, actualmente no hay métodos eficientes para la manipulación genética de este organismo [15]. Otra alternativa para mejorar la bioproducción de n-butanol es la identificación de los genes de *L. brevis* involucrados en la tolerancia al n-butanol y otros inhibidores, para luego utilizarlos en la construcción e ingeniería de cepas de *E. coli* más resistentes aprovechando la versatilidad en su manipulación.

La hipótesis de esta investigación es que existe uno o varios genes y/o rutas metabólicas en *L. brevis* que al ser expresados en *E. coli* confieren resistencia al n-butanol y otros fenotipos de interés. En el presente trabajo se construyó una biblioteca genómica de *L. brevis* expresada en *E. coli* útil para identificar genes involucrados en

diferentes fenotipos de interés industrial, particularmente la biblioteca se utilizó para identificar genes involucrados en la tolerancia al n-butanol.

OBJETIVOS

General:

- ✓ Identificar genes de *L. brevis* que al ser expresados en *E. coli* aumenten la tolerancia al n-butanol.

Específicos:

- ✓ Construir una biblioteca genómica de *L. brevis* expresada en *E. coli*.
- ✓ Realizar enriquecimientos para seleccionar los clones potenciales de la biblioteca.
- ✓ Secuenciar y analizar la poblaciones enriquecidas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CONCEPTOS Y HERRAMIENTAS BÁSICAS DE CLONACIÓN MOLECULAR

La clonación molecular hace referencia a un conjunto de métodos experimentales en donde se aísla una secuencia de ADN de interés y se obtienen múltiples copias de ella gracias a la acción de una población de microorganismos [16,17]. Se utilizan diferentes equipos y tecnologías basadas en la acción de enzimas que realizan los diferentes cortes, síntesis y ensamblajes de las secuencias de ADN con el fin de realizar la construcción deseada.

1.1.1 *Escherichia coli*

E. coli es el microorganismo facultativo predominante en el tracto gastrointestinal [18], la mayoría de las cepas no son patógenas. Esta bacteria gram-negativa es el organismo más caracterizado a nivel genético a pesar de que la función de muchos de sus genes aún es desconocida [19]. *E. coli* ha demostrado ser un microorganismo versátil y fácil de manipular, constituyéndose como un excelente huésped para la clonación de diferentes genes [20]. Una de las especies no patógenas más utilizada en ingeniería genética es la *E. coli* K-12 [21]. Particularmente, en este trabajo se utilizó la cepa *E. coli* K.12 BW25113 ($\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, *lambda-*, *rph-1*, $\Delta (rhaD-rhaB)568$, *hsdR514*) como huésped en las clonaciones realizadas.

1.1.2 Plásmidos

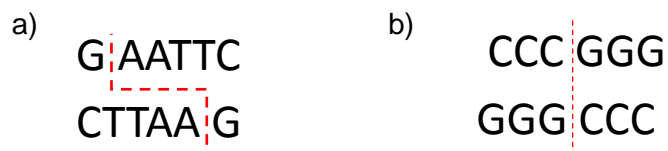
Los plásmidos son secuencias de ADN extracromosómico. Estas moléculas expresan genes que no son fundamentales para el funcionamiento de las bacterias, y pueden replicarse de manera independiente en el interior de ellas. En ingeniería genética los plásmidos funcionan como vectores en donde se ensamblan las secuencias de ADN que se desean clonar [22]. Los plásmidos son fáciles de manipular y su estructura

generalmente se representa mediante un círculo en donde se resaltan los genes más importantes.

1.1.3 Enzimas de restricción

Una enzima de restricción (o endonucleasa de restricción) es aquella enzima que puede reconocer una secuencia de ADN en particular y cortarla selectivamente. El mecanismo de acción de estas enzimas se focaliza en la ruptura de los enlaces fosfodiéster en las cadenas de ADN. Esta ruptura origina dos extremos que pueden ser romos o cohesivos dependiendo del mecanismo de acción de la enzima (Ver figura 1) [22]. Utilizando estas enzimas es posible cortar los plásmidos en diferentes fragmentos deseados. Es muy importante identificar la acción de corte de las enzimas de restricción, pues de ello depende en gran medida la estrategia de clonación. Para poder ensamblar una secuencia de ADN en un plásmido las secuencias terminales de las cadenas a ensamblar deben ser compatibles, en general, si los terminales son romos casi siempre son compatibles, sin embargo, si las secuencias terminales son cohesivas deben haber sido cortadas por la misma endonucleasa de restricción o una enzima compatible que genere pestañas de igual secuencia [22].

Figura 1. Mecanismo de corte enzimas de restricción. a) Mecanismo de corte de *EcoRI* dejando extremos cohesivos b) Mecanismo de corte de *SmaI* dejando extremos romos.



1.1.4 Reacción de polimerasa en cadena (PCR)

La reacción PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es una síntesis in-vitro de ADN. El proceso consiste en la amplificación de una secuencia de ADN gracias a la acción de la enzima ADN polimerasa, la cual ensambla desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTP) complementarios a una secuencia modelo. Esta región está definida por los iniciadores,

los cuales son pequeñas moléculas de ADN sintetizadas químicamente (oligonucleótidos), que deben ser idénticas a las secuencias de los extremos de la región que se desea amplificar. Existen 2 tipos de iniciadores el iniciador hacia adelante y el iniciador reverso, la ADN polimerasa es capaz de reconocer estos iniciadores y amplificar únicamente la zona definida por ellos. La reacción de PCR ocurre en un termociclador donde se realizan varios ciclos de calentamiento y enfriamiento produciendo millones de copias de la secuencia segmentada por los iniciadores. [23]

1.1.5 Pasos clave en clonación molecular

Aislamiento del inserto. Consiste en aislar la secuencia de ADN que se desea clonar, generalmente se utiliza la amplificación por PCR, la digestión enzimática, o algún otro método de fragmentación genómica (Ej. sonicación) [52].

Digestión enzimática. Consiste en cortar con las enzimas de restricción adecuadas el vector seleccionado, y si es el caso el inserto a clonar.

Reparación de terminales. En el caso de que el vector y el inserto hayan sido cortados usando diferentes métodos de fragmentación o enzimas de restricción, se deben reparar los terminales utilizando una enzima con actividad exonucleasa (ADN polimerasa), que remueva o llene de nucleótidos los extremos hasta que sean romos [24,25]. Generalmente las clonaciones en donde los terminales no son compatibles son más ineficientes, ya que la acción de esta enzima puede degradar excesivamente los extremos de las cadenas de ADN [26].

Desfosforilación del vector. En la mayoría de clonaciones se remueve el grupo fosfato en uno de los extremos del vector linearizado utilizando una fosfatasa alcalina [25,27], este proceso se conoce como desfosforilación, y se hace con el fin de prevenir que la ligasa ensamble los terminales del vector produciendo la recircularización del mismo.

Ligación. Una vez los finales son compatibles y el vector es desfosforilado, los fragmentos son ensamblados utilizando la enzima ADN ligasa, que forma enlaces covalentes entre los terminales de las cadenas nucleotídicas [25,28].

Transformación. Después de la reacción de ligación, el producto es introducido en la cepa silvestre mediante un proceso conocido como transformación [22]. Generalmente se realiza un tratamiento previo a las células que van a ser transformadas, pues éstas deben ser competentes al método y aptas para recibir material genético externo [29], los métodos más utilizados en este proceso son la electroporación [30] y la transformación química por choque térmico [31].

Selección. Después de la transformación las células son incubadas en platos de agar en presencia del antibiótico codificado por el vector, aquellas células que no posean el gen de resistencia no sobrevivirán a la presencia del antibiótico, por consiguiente, se espera que las colonias resultantes sean los productos de las clonaciones realizadas. En los experimentos de clonación es conveniente utilizar controles para evitar los falsos positivos del proceso, tales como la ineficiencia del antibiótico, la digestión incompleta y la recircularización del vector. Uno de los controles más utilizados es transformar e incubar el producto de una reacción de ligación en donde solo fue añadido el vector cortado y desfosforilado. Calculando la relación entre el número de colonias obtenidas en el producto de clonación y el control negativo es posible estimar una eficiencia de la clonación [25].

1.2 BIBLIOTECAS GENÓMICAS

1.2.1 Que es una biblioteca genómica?

Una biblioteca genómica es la colección del ADN genómico de un organismo, en donde éste es fragmentado y clonado en un conjunto de vectores de expresión idénticos, los cuales pueden ser replicados y propagados en una población de microorganismos [22]. Se espera que cada vector tenga un fragmento insertado

diferente y cada célula de la población sea portadora de al menos un vector con inserto. Una biblioteca genómica en teoría contiene todas las secuencias del genoma de origen, incluyendo un inserto de interés. Se puede hacer una analogía entre una biblioteca de libros y una biblioteca genómica, cada fragmento de ADN genómico podría representar un libro diferente en donde se encuentra información desconocida inicialmente, la colección de las células expresando los vectores con los fragmentos de ADN genómico clonados, correspondería a la colección de libros con toda la información almacenada.

1.2.2 Para qué sirven las bibliotecas genómicas?

Las bibliotecas genómicas son generalmente utilizadas para aplicaciones de secuenciación. Ellas han jugado un papel importante en la secuenciación completa de varios organismos incluyendo el genoma humano [32]. También son de gran utilidad a la hora de descubrir la funcionalidad de diferentes genes. Para el caso de los estudios de inhibición y la respuesta de los microorganismos frente a las condiciones de estrés, las bibliotecas genómicas son ideales, pues al someter la biblioteca frente a la acción del inhibidor las células que sobreviven o muestran mejor adaptación corresponden a aquellas portadoras de los vectores expresando los fragmentos del genoma que confieren la resistencia [33,34].

1.2.3 Cobertura de una biblioteca genómica

La cobertura indica el número de veces que se representa el genoma de un organismo en una biblioteca, puede ser calculada utilizando la siguiente ecuación:

Ecuación 1.

$$C = \frac{Nf * F}{G}$$

C: Cobertura, [Cantidad de genoma por biblioteca].

Nf: Número de fragmentos = Numero de colonias por biblioteca.

G: Tamaño del genoma, [pares de base por genoma].

F: Tamaño promedio de los fragmentos, [base pares de base por fragmento].

En algunas ocasiones la orientación de los fragmentos clonados en un vector es importante. En este caso existiría un ~50 % de probabilidad de que los insertos sean ensamblados en la orientación deseada, la cobertura sería entonces la mitad del valor proporcionado por la ecuación 1 [35,36].

1.2.4 Enriquecimiento de una biblioteca genómica

Los enriquecimientos constituyen una estrategia para descifrar la información contenida en una biblioteca genómica construida y revelar la funcionalidad de uno o varios genes contenidos. Básicamente consiste en una serie de inoculaciones en ciertas condiciones tales que las células portadoras de los plásmidos con insertos que confieren el fenotipo deseado, se adaptan de mejor forma a las condiciones sometidas. El enriquecimiento de bibliotecas genómicas ha sido utilizado satisfactoriamente para estudiar la tolerancia a los inhibidores (etanol y butanol) en algunos microorganismos tales como *E. coli* [34,37], *Sacharomyces cerevisiae* [38] y *C. acetobutylicum* [33]. Todas estas bibliotecas fueron construidas y analizadas utilizando el genoma proveniente del huésped de las clonaciones. El presente trabajo se enfoca en la construcción de una biblioteca genómica heteróloga, en donde los insertos de ADN provienen de un microorganismo diferente del huésped, con el fin de descubrir genes que puedan ser utilizados en la construcción de híbridos para combinar características benéficas entre dos microorganismos (*L. brevis* y *E. coli*).

1.3 SECUENCIAS GENÓMICAS DE *ESCHERICHIA COLI* Y *LACTOBACILLUS BREVIS*

Las secuencias genómicas de *E. coli* y *L. brevis* están disponibles [21,39]. El genoma de *E. coli* tiene un tamaño de 4.64 Mpb (Mega pares de bases), y contiene aproximadamente 4400 genes que codifican proteínas. El genoma de *L. brevis* ATCC 367 tiene un tamaño de 2.34 Mpb y contiene aproximadamente 2300 genes codificadores de proteínas. En adición al cromosoma, *L. brevis* contiene dos mega

plásmidos de 13.5 Kpb y 35.6 Kpb. La disponibilidad en la secuencia de estos genomas es fundamental y hace posible el desarrollo de herramientas genómicas para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en los diferentes fenotipos de interés exhibidos por los microorganismos.

1.4 MECANISMOS MOLECULARES CONOCIDOS INVOLUCRADOS EN LA TOLERANCIA AL N-BUTANOL

Estudios acerca de los efectos del n-butanol en *C. acetobutylicum* muestran que este compuesto incrementa la fluidez de la dispersión de lípidos en la membrana, interrumpiendo la habilidad de las células para regular los niveles de pH, además de bajar los niveles intracelulares de ATP e inhibir la captación de glucosa [40,41]. Algunos genes involucrados en la tolerancia al n-butanol han sido identificados en *C. acetobutylicum* y en *E. coli*, usando el enriquecimiento de bibliotecas genómicas [33,34]. En *C. acetobutylicum* fueron identificados 16 genes codificando reguladores transcripcionales y algunas proteínas involucradas en el transporte de nutrientes. En *E. coli* los genes enriquecidos estaban involucrados con funciones en la membrana, transporte de aminoácidos, transporte de azúcares y proteínas involucradas en la respuesta a varios inhibidores en general. [33]. La respuesta de *L. brevis* al n-butanol ha sido estudiada por análisis transcripcional, los resultados revelan que *L. brevis* responde a la inhibición del n-butanol protegiéndose contra el estrés oxidativo, incrementando la captación de carbono, alterando el transporte de iones y aumentando la síntesis de ácidos grasos [42].

Teniendo en cuenta los estudios anteriormente mencionados, se espera que en el presente trabajo sean identificados genes de *L. brevis* relacionados con la estabilidad de la membrana, el incremento en la obtención de carbono y azúcares, reguladores transcripcionales, sistemas de transporte, transportadores de iones, y genes relacionados con tolerancia a diferentes inhibidores en general (calor, estrés oxidativo, presión osmótica, etanol, etc.).

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El ADN genómico de *L. brevis* ATCC 367 se utilizó como base para la construcción de la biblioteca heteróloga de ADN expresada en *E. coli* BW25113. En vista de que más del 90 % de los marcos abiertos de lectura (secuencia de ADN comprendida entre un codón de inicio y un codón de terminación) en *L. brevis* son de 2000 pb o menos [29], fragmentos entre 1000 y 2500 pb fueron seleccionados para la construcción de la biblioteca. Generalmente los fragmentos de menor tamaño son clonados con mayor eficiencia en una reacción de ligación [25]. Con el fin de evitar una posible polarización de la biblioteca, los fragmentos fueron separados en tres diferentes tamaños, 1000 - 1500 pb, 1500 - 2000 pb y 2000 - 2500 pb, cada tamaño corresponde a una biblioteca diferente. Adicionalmente se hizo una biblioteca combinada mezclando una porción de cada una de las tres bibliotecas construidas. El plásmido pYG2 se seleccionó como vector de expresión (Figura 2), este plásmido cuenta con el promotor sintético inducible LacO1, con el cual es posible manipular la expresión de los genes clonados adicionando IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) [51]. Seguido de LacO1 se encuentra el sitio de restricción como *SmaI* y luego el terminador transcripcional *rrnB*. Como los niveles de expresión pueden tener efectos significativos en la fisiología y en el fenotipo exhibido por el organismo, se decidió someter las bibliotecas generadas a diferentes concentraciones de IPTG y así aumentar la probabilidad de encontrar genes cuya expresión otorgue el fenotipo deseado. En la figura 3 se muestra un diagrama general del desarrollo experimental.

Figura 2. Mapa circular del plásmido pYG2, con sus partes más relevantes.

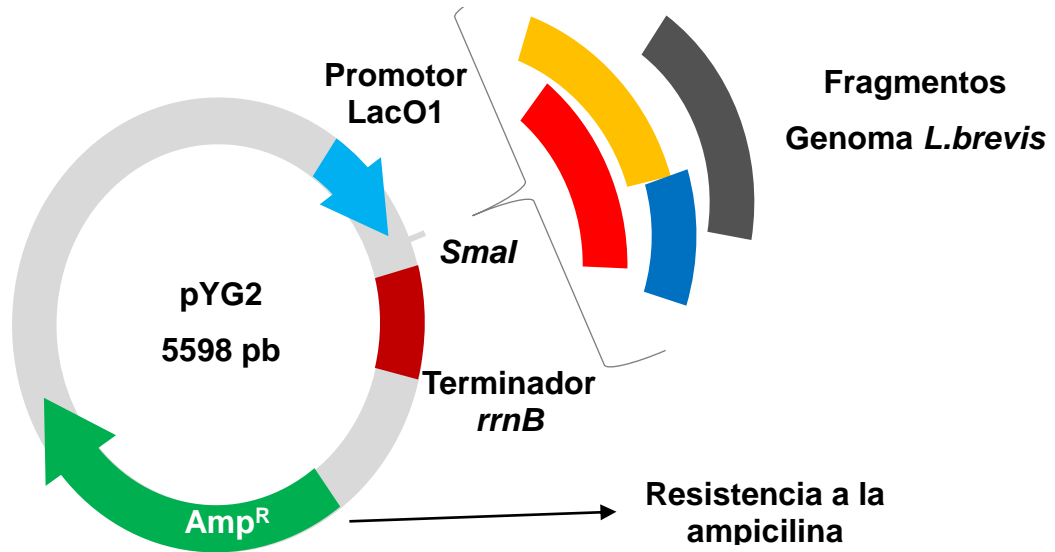
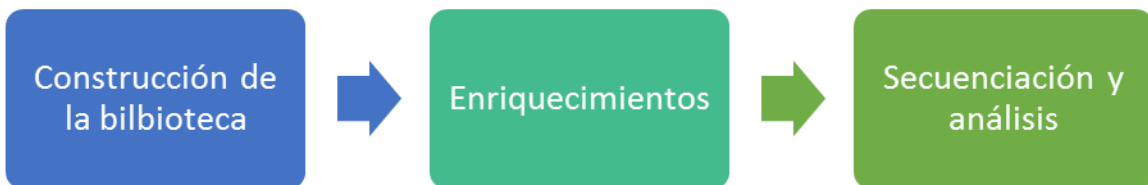


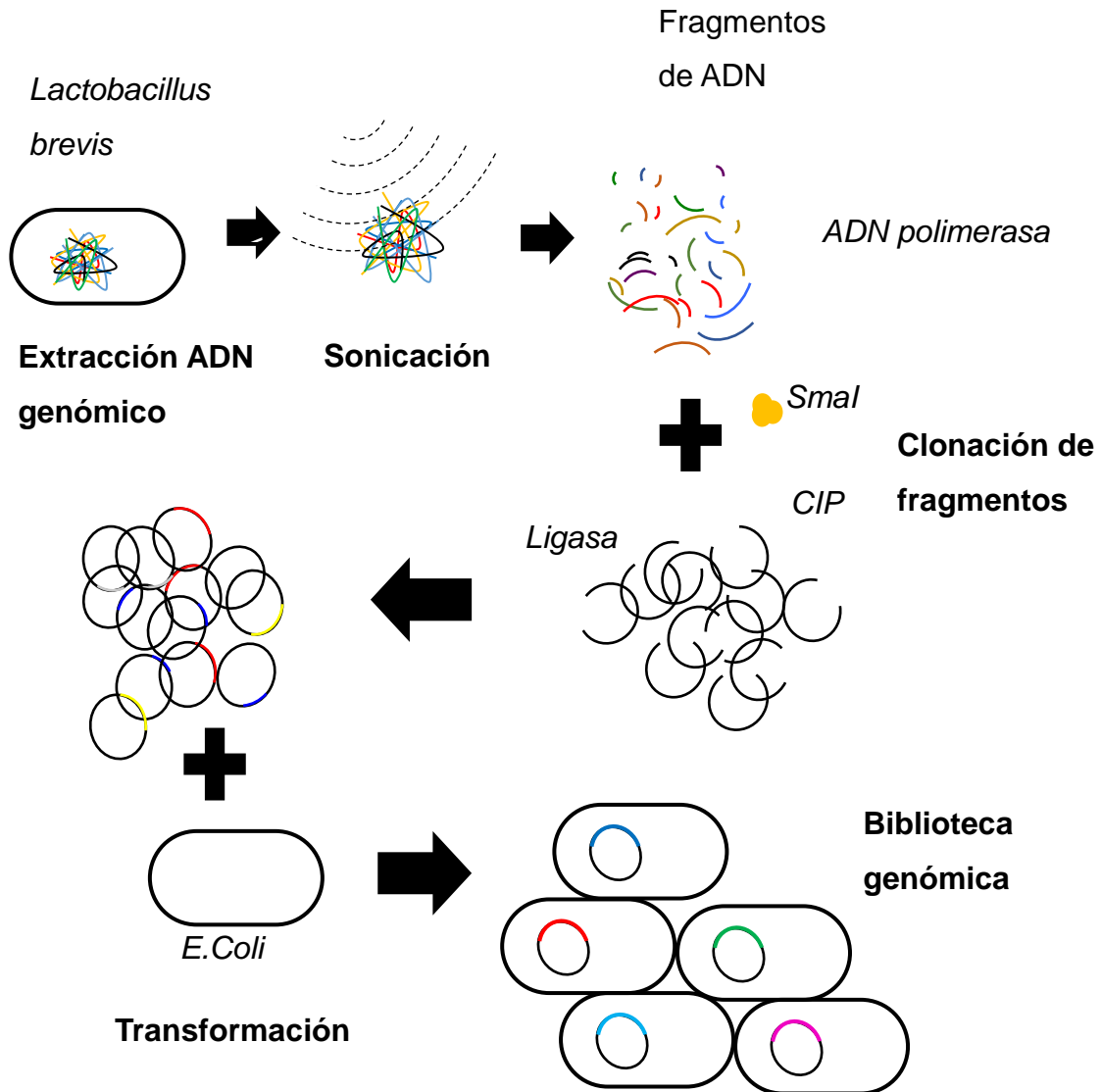
Figura 3. Desarrollo experimental



2.1 CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA

El ADN genómico de *L. brevis* fue extraído usando “ZR FungalBacterial DNA MidiPrep™” (ZYMO RESEARCH); posteriormente fue fragmentado por sonicación usando “Digital Sonifier” (BRANSON). El ADN fragmentado fue separado por electroforesis en gel de agarosa (Anexo D), usando “Mupid exu Electrophoresis system” (MUPID), 3 fragmentos en los rangos de 1-1.5 kpb, 1.5-2 kpb y 2-2.5 kpb fueron extraídos del gel y purificados usando “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega); Después de la purificación los finales de los fragmentos extraídos fueron reparados usando *T4 DNA Polymerase* (NEB). El vector pYG2 fue cortado utilizando la enzima *SmaI* (NEB), la reacción de digestión se realizó durante ~16 h a 25 °C. Para prevenir la recircularización, el vector fue defosforilado utilizando la enzima *Alkaline Phosphatase Calf Intestinal (CIP)* (NEB), durante 30 min a 37 °C. Los fragmentos de cada tamaño fueron ligados en el sitio *SmaI* del plásmido pYG2 utilizando la enzima *T4 DNA Ligase* (NEB). Adicionalmente se realizó una reacción de control negativo en donde únicamente se adicionó el vector cortado y defosforilado pYG2. Las reacciones de ligación se incubaron durante ~72 h a 4 °C, luego de la incubación los productos de las reacciones se purificaron usando “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega). Los productos de ligación fueron transformados por electroporación usando “Gene PulserMXcell Electroporation System” (Bio-rad) en células electrocompetentes de *E. coli* BW25113. Después del choque la células se recuperaron en 1 mL de SOC a 37 °C durante 1 h y se sembraron en platos de agar LB (Anexo A) suplementados con 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C durante ~16 h. Se realizaron aproximadamente 100 transformaciones durante un mes, las colonias obtenidas fueron recuperadas y clasificadas en 4 bibliotecas 1-1.5 Kpb, 1.5-2 Kpb, 2-2.5 Kpb y una mezcla global de las tres. En la figura 4 se representa gráficamente este proceso de construcción. En el Anexo B se muestran los detalles de los protocolos utilizados en las reacciones enzimáticas y demás procesos involucrados en la construcción de la biblioteca genómica.

Figura 4. Construcción biblioteca genómica.



2.2 ENRIQUECIMIENTO DE LAS BIBLIOTECAS

Se desarrolló una serie de enriquecimientos con el fin de seleccionar los clones de *E. coli* expresando genes de *L. brevis* capaces de conferir tolerancia al n-butanol. Las 4 bibliotecas genómicas construidas y el control negativo BW25113/pYG2 se inocularon en 5 mL de medio líquido M9 (Anexo A) suplementado con 0.4 % de glucosa, 1 % v/v de n-butanol (concentración crítica para *E.coli* [7,22]) y 100 µg/ml de ampicilina (Amp) a 37 °C. Cada serie de enriquecimiento consistió en 3 réplicas biológicas de cada biblioteca y el control negativo BW25113/pYG2 sometidos a 3 concentraciones del inductor IPTG (0, 0.1 y 1 mM) (Figuras 5 y 6). Para estimar el crecimiento de las poblaciones se utilizó el espectrofotómetro “BioMate 3 UV-Visible” (Thermo Scientific), el cual mide la densidad óptica para una longitud de onda dada [22]. Las poblaciones que mostraron un crecimiento significativo (Densidad óptica $DO_{600} > 0.3$) se enriquecieron varias veces hasta que no se observó una gran diferencia en el crecimiento. Posteriormente se sembraron en platos selectivos de agar LB con ampicilina (100 µg/mL). Algunas colonias fueron seleccionadas aleatoriamente de cada muestra y verificadas con PCR de colonia usando *Taq polimerase* (NEB) y los iniciadores pYG2_f y pYG2_r, alineados 200 pb arriba y 200 pb abajo del sitio *SmaI* en el plásmido pYG2 (Anexo C), con el fin comprobar la presencia de los fragmentos insertados. Las colonias seleccionadas con los fragmentos satisfactoriamente clonados se sometieron nuevamente a la acción del inhibidor (1 % v/v n-butanol), en medio mínimo M9 para confirmar el aumento en la tolerancia al n-butanol. Con el fin de descartar la posibilidad de que el mejoramiento en la resistencia fuera debido a mutaciones en el genoma producto de fenómenos de evolución adaptativa, los plásmidos de las colonias fueron extraídos usando “Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit” (Zymo Research) y transformados por electroporación en células electrocompetentes de la cepa silvestre *E. coli* BW25113 usando “Gene PulserMXcell Electroporation System” (Bio-rad). Las células transformadas fueron inoculadas en los medios LB y M9 suplementados con 1 % v/v de n-butanol y 100 µg/mL de ampicilina.

Figura 5. Estrategia de enriquecimientos, cada color representa una concentración del inductor IPTG.

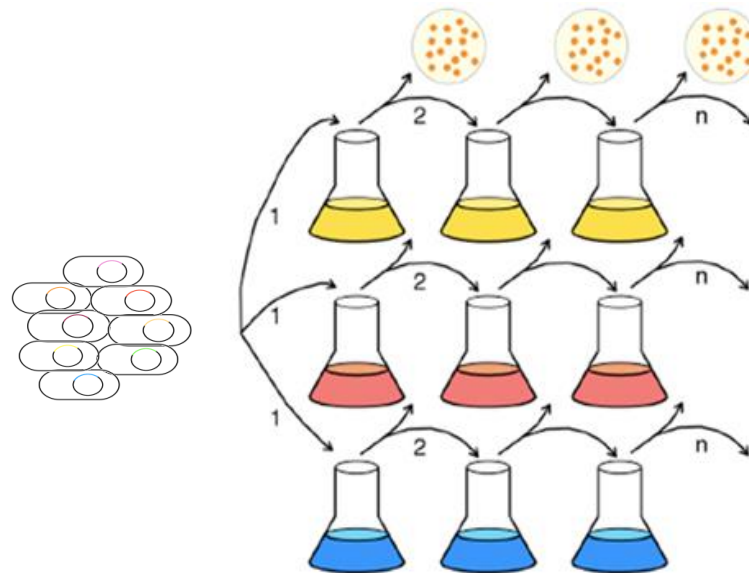


Figura 6. Representación gráfica de las réplicas inoculadas para los enriquecimientos realizados.

		Réplicas biológicas inoculadas								
		1-1.5 Kpb		1.5-2 Kpb		2-2.5 Kpb		Mezcla		
IPTG [mM]	0									
	0.1									
	1									

2.3 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS

Los plásmidos de las muestras inoculadas luego de la última transformación que siguieran demostrando un crecimiento significativo ($DO_{600} > 0.3$) en la presencia del inhibidor (1% n-butanol) fueron extraídos usando “Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit” (Zymo Research) y enviados al “Texas A&M Genomics Center” para su secuenciación usando los iniciadores pYG2_f y pYG2_r y el equipo “Illumina HiSeq 2000” (Illumina). La secuencia obtenida fue comparada con la secuencia del genoma de *L. brevis* ATCC 367 usando la herramienta computacional BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) [43], con el fin de identificar potenciales genes de *L. brevis* que al ser expresados en *E. coli* confieren tolerancia al n-butanol. Una vez caracterizada la secuencia obtenida, se compararon los resultados obtenidos con los reportes en la literatura.

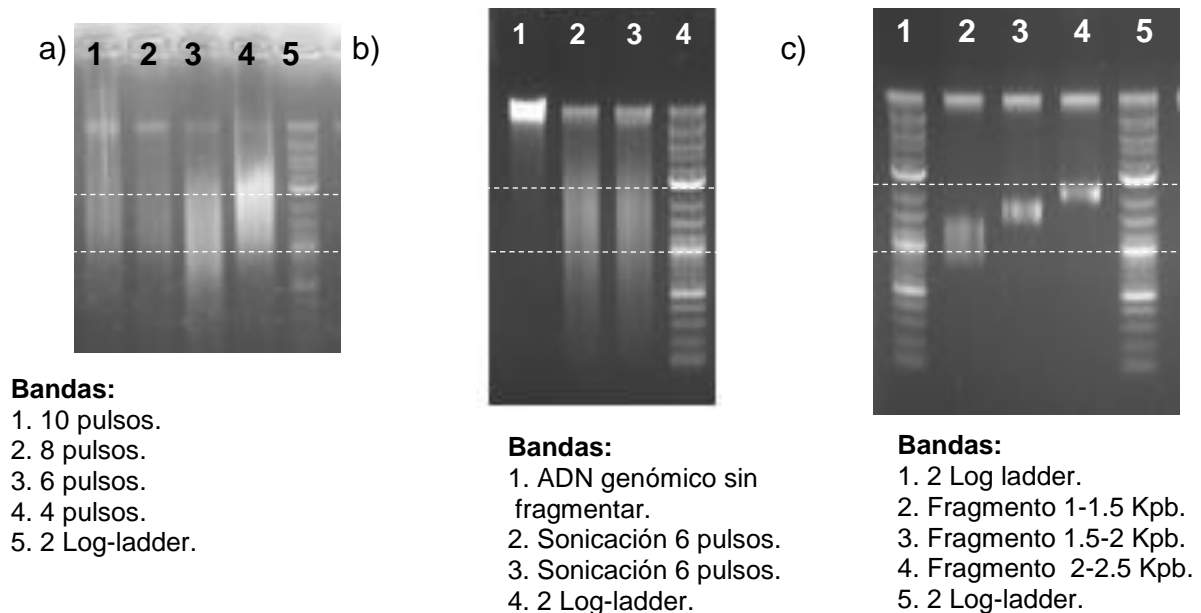
3. RESULTADOS

3.1 CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA

3.1.1 Sonicación y extracción de fragmentos en gel de agarosa

Se realizaron diferentes pruebas de sonicación variando la cantidad de pulsos a la mínima potencia emitida por el equipo utilizado, "Digital Sonifier" (BRANSON), cada pulso corresponde a una perturbación de 1 segundo (Ver Figura 7). En las figuras 7.a y 7.b se puede observar que al utilizar 6 pulsos el ADN es fragmentado de una mejor manera en el rango deseado (1-2.5 Kpb). En la figura 7.c se muestran los fragmentos luego de la extracción en gel de agarosa, se observa que los fragmentos extraídos están dentro de los tamaños esperados.

Figura 7. Sonicación y extracción de fragmentos de ADN en gel de agarosa. a) Pruebas de sonicación; b) Sonicación ADN genómico 6 pulsos; c) Extracción de fragmentos para la clonación.



3.1.2 Clonación de fragmentos y transformaciones

Se construyó satisfactoriamente una biblioteca genómica de *L. brevis* expresada en *E. coli* clasificada en tres diferentes tamaños, adicionalmente se realizó una mezcla global mezclando una porción de cada una de las tres clasificaciones construidas. En la tabla 1 se muestra un resumen del número de colonias obtenido y la cobertura alcanzada en cada biblioteca.

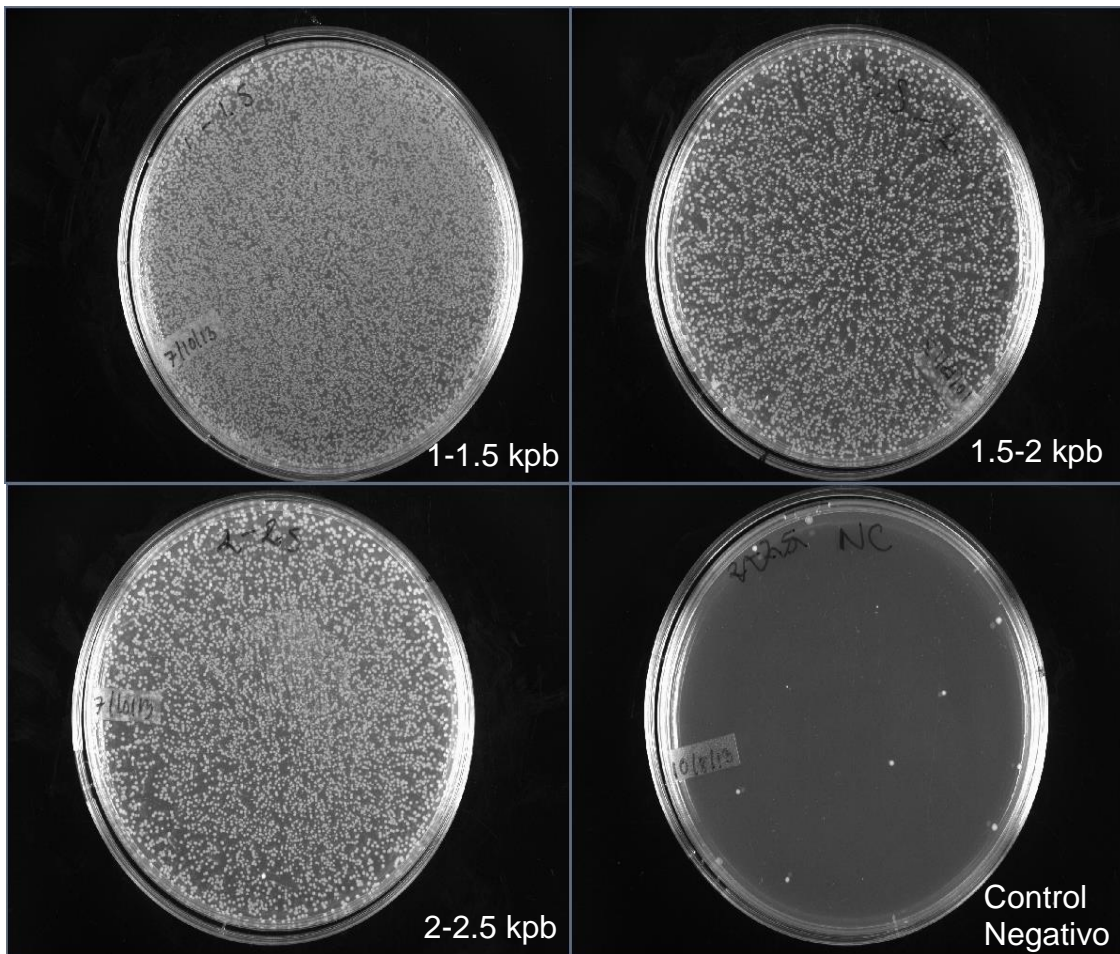
Tabla 1. Número de colonias y cobertura alcanzada por las bibliotecas.

Tamaño de los fragmentos [Kpb]	Transformaciones realizadas	Número total de colonias obtenido (Nf)	Cobertura del genoma de <i>L. brevis</i> alcanzada (C)
1 - 1.5	45	220701	60
1.5 - 2	27	53481	20
2 - 2.5	27	55045	30
TOTAL	99	329227	110

Como se puede observar se realizaron 99 transformaciones, el número total de colonias obtenidas (329227) alcanzó una cobertura global de ~110, esto fue resultado de la eficiencia obtenida en las clonaciones realizadas (Figura 8).

En la figura 8 se muestra algunos de los resultados de las transformaciones, se puede observar que la relación entre el número de colonias correspondientes a las reacciones de ligación y el control negativo (plásmido pYG2 linealizado) es alto, de esto se puede inferir que la mayoría de colonias obtenidas en las bibliotecas corresponden a los productos de las reacciones de ligación deseadas.

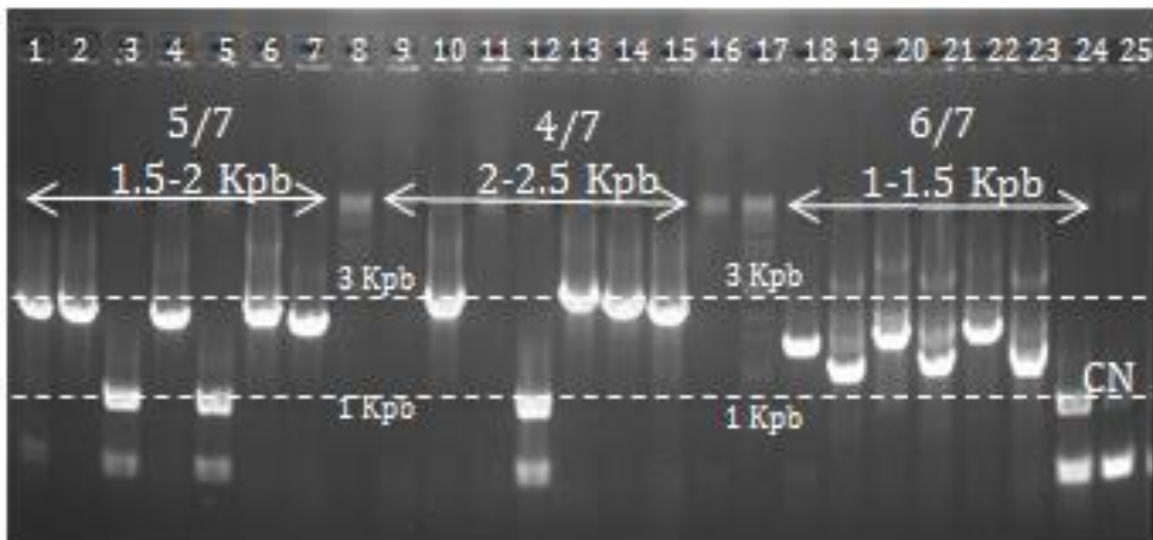
Figura 8. Fotografía muestra de algunas de las transformaciones realizadas. Platos de agar LB suplementados con 100 µg/mL de Amp, con 50 µL de células transformadas. a) 1-1.5 Kpb; b) 1.5-2 Kpb; c) 2-2.5 Kpb; d) Control negativo.



Según la verificación por PCR de colonia se puede confirmar el éxito de estas clonaciones, la mayoría de las bandas obtenidas al analizar 7 colonias aleatorias de algunas muestras seleccionadas, se encuentran dentro de los tamaños esperados (Figura 9). Las bandas simples garantizan la presencia de los diferentes fragmentos clonados en el plásmido pYG2, la presencia de una doble banda como las número 3,

5,12 y 24 significa un falso positivo es decir un plásmido pYG2 sin fragmento insertado. Las bandas 8 y 17 corresponden a la guía 2-Log ladder (Anexo D). La banda 25 corresponde al control negativo.

Figura 9. Verificación por PCR de colonia.



3.2 ENRIQUECIMIENTO DE LAS BIBLIOTECAS

Solo en una de las poblaciones correspondientes a la biblioteca global, inoculada sin inducción de IPTG se observó un crecimiento significativo ($DO_{600} > 0.3$) y fue enriquecida varias veces, mientras que los controles negativos y las demás réplicas inoculadas no crecieron (Figura 10).

Figura 10. Fotografía población enriquecida: BW25113/pYG2::1-2.5 (izquierda), Control Negativo BW25513/pYG2 (derecha).

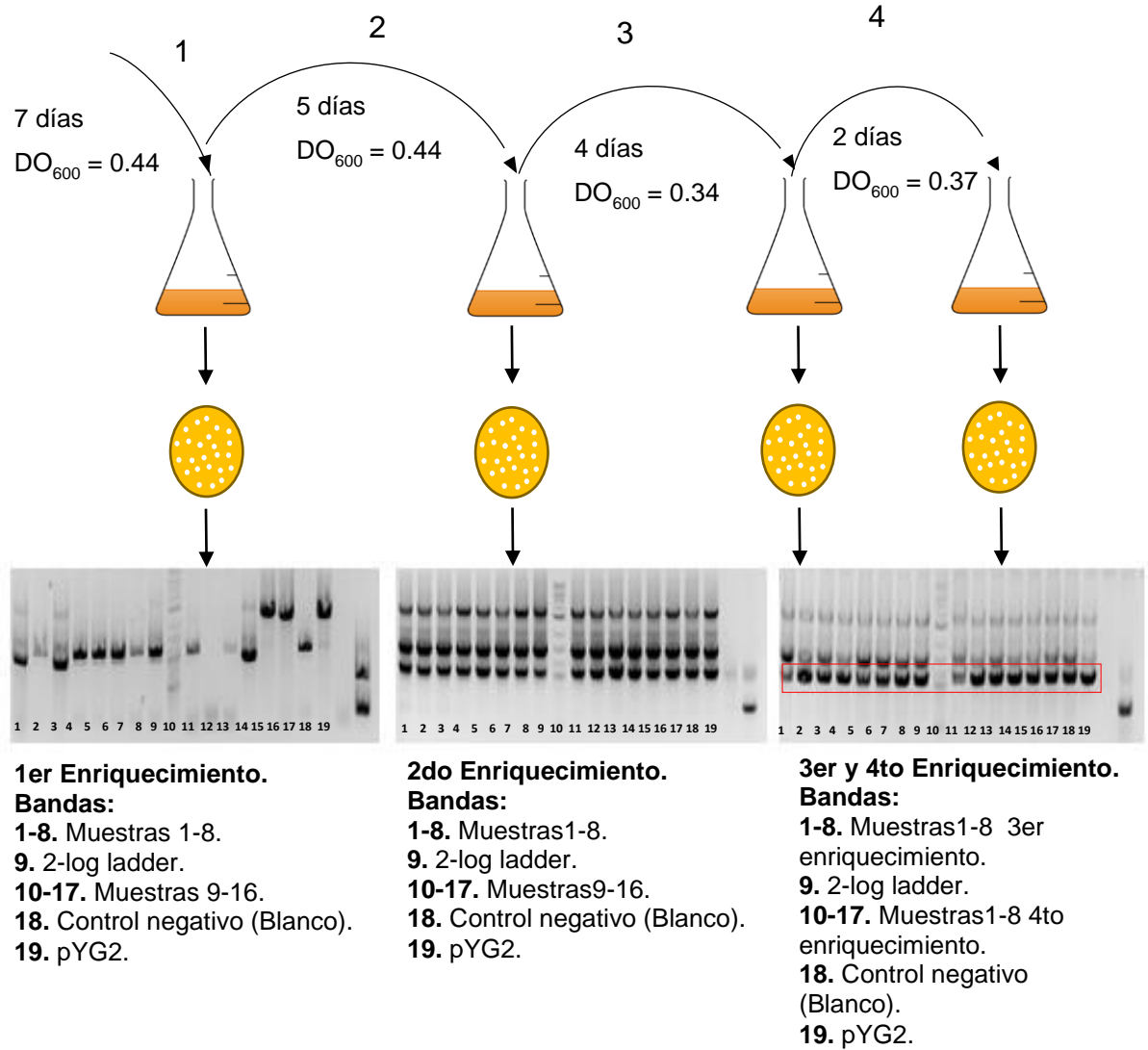


El tiempo necesario para alcanzar un crecimiento significativo fue cada vez menor en cada serie de enriquecimiento (7, 5, 4 y 2 días para los enriquecimientos 1 - 4 respectivamente) y fue estable a partir del cuarto enriquecimiento (2 días). Este resultado se visualiza gráficamente en la figura 11.

La verificación por PCR de colonia realizada en cada uno de los enriquecimientos sugiere que en el primer enriquecimiento los fragmentos insertados tienen diferentes tamaños, sin embargo, en los siguientes enriquecimientos las bandas tienen aproximadamente el mismo tamaño de esto se puede inferir que uno o más genes de un tamaño en particular (~1 Kpb) están siendo enriquecidos (Figura 11).

Figura 11. Visualización gráfica de los enriquecimientos realizados y la verificación por PCR de colonia de cada muestra aislada.

Biblioteca combinada sin inducción de IPTG



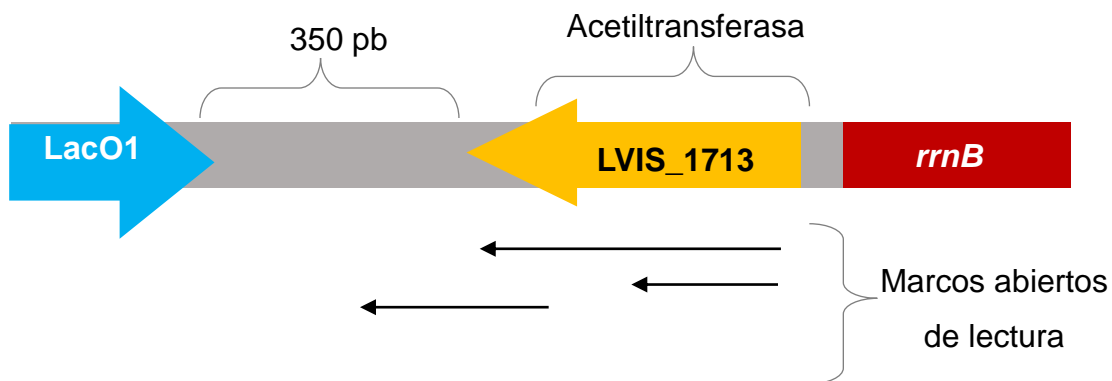
Estos resultados sugieren que en esta réplica biológica algunos de los fragmentos del genoma de *L.brevis* clonados en el plásmido pYG2 fueron enriquecidos y su expresión en *E. coli* aumentó la resistencia al n-butanol. Como se mencionó anteriormente, los controles y las demás réplicas inoculadas no fueron capaces de crecer mientras esta réplica sí. La inducción de IPTG no fue necesaria para el enriquecimiento, sin embargo, esto no significa que los niveles de expresión no tengan efectos significativos, pues a este nivel no se conoce con certeza la acción del promotor LacO1 sobre el fragmento enriquecido.

Los plásmidos de dos de las colonias analizadas por PCR después del último enriquecimiento fueron extraídos, y transformados en cepas silvestres de *E.coli* BW25113, no se observó crecimiento significativo luego de varios días de incubación en el medio mínimo M9 suplementado con 1 % de n-butanol. Sin embargo, en el medio LB se observó crecimiento significativo (2 días) en comparación al control negativo el cual no fue capaz de crecer. De esto se puede inferir que el fragmento clonado en el plásmido enriquecido contiene algunos determinantes funcionales que confieren resistencia al butanol, pero su coeficiente de adaptación no es muy alto [44], pues no es suficiente para que las bacterias sobrevivan a la concentración crítica (1 % v/v n-butanol) en el medio mínimo en nutrientes M9, mientras si lo pueden hacer en el medio rico en nutrientes LB al 1 % v/v de n- butanol. Es evidente que en los enriquecimientos realizados en el medio M9 se desarrolló una mutación en el genoma de *E. coli* que aumentó significativamente la tolerancia al n-butanol.

3.3 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS

Los resultados de la secuenciación muestran que los dos plásmidos analizados contienen el mismo fragmento insertado. Según el resultado de la herramienta computacional BLAST el fragmento incluye la mayor parte del gen de *L.brevis* LVIS_1713 el cual codifica la acetiltransferasa [39], careciendo de ~200 pb desde el codón inicial, seguido de ~350 pb de secuencia no codificante (Figura 12).

Figura 12. Orientación del fragmento secuenciado con respecto al promotor LacO1 en el plásmido pYG2.



En pYG2 el gen LVIS_1713 se encuentra en una posición opuesta al promotor LacO1. Esto sugiere que en este fragmento alguno de los marcos abiertos de lectura presentes son funcionales, y su expresión confiere resistencia al n-butanol en *E. coli*. A pesar de que no está presente completa la secuencia del gen LVIS_1713, la porción correspondiente codifica un marco abierto de lectura de 347 pb.

Actualmente no se reportan estudios relacionados con la funcionalidad del gen LVIS_1713, solo se conoce que este gen codifica la acetiltransferasa [29]. Esta enzima pertenece a la familia de las transferasas, las cuales están involucradas en el metabolismo de diferentes aminoácidos esenciales para el crecimiento celular, como su nombre lo indica la función de este tipo de enzimas es la transferencia de un grupo funcional de una molécula a otra. Específicamente la acetiltransferasa se encarga de transferir el grupo acetil entre diferentes moléculas dependiendo de cada organismo y su metabolismo [45].

Según diferentes estudios se ha descubierto que las acetiltransferasas están involucradas en los mecanismos de adaptación de los microorganismos frente a ciertos inhibidores tales como compuestos aromáticos tóxicos, etanol, y estrés oxidativo [46-49].

Los resultados obtenidos a partir de este estudio sugieren que podría haber una posible relación entre la actividad de la acetiltransferasa codificada por el gen LVIS_1713 de *L. brevis* y la tolerancia al n-butanol al ser expresada en *E. coli*, sin embargo, tal afirmación no es posible de realizar hasta no hacer un estudio experimental más detallado, dividiendo la secuencia del fragmento enriquecido en los marcos abiertos de lectura presentes, ya que en el mismo no está completa la secuencia del gen LVIS_1713.

4. CONCLUSIONES

Se construyó satisfactoriamente una biblioteca genómica de *L. brevis* expresada en *E. coli*, útil para identificar genes involucrados en diferentes fenotipos, en este caso, la biblioteca fue sometida a una serie de enriquecimientos para identificar genes involucrados en la tolerancia al n-butanol.

Mediante una serie de enriquecimientos en medio mínimo M9 se identificó que la expresión de un fragmento del genoma *L. brevis* cuya mayor parte corresponde a la secuencia del gen LVIS_1713 que codifica la acetiltransferasa, está involucrado en el aumento de la tolerancia al n-butanol en *E. coli*.

El presente trabajo es un aporte al conocimiento de los genes involucrados en la tolerancia al n-butanol y es el primer aporte al conocimiento de genes de *L. brevis* que al ser expresados en *E. coli* confieren resistencia al n-butanol. Como tal, también comprende un avance al desarrollo de herramientas moleculares para la ingeniería de microorganismos con aplicaciones industriales.

5. RECOMENDACIONES

Es conveniente realizar un análisis más exhaustivo del fragmento enriquecido y de la secuencia completa del gen LVIS_1713. Para ello se sugiere aislar los marcos abiertos de lectura presentes en el fragmento y realizar por separado pruebas de inhibición expresando las secuencias aisladas. Por otro lado, se recomienda hacer análisis cinéticos de expresión en *E.coli* de la secuencia completa del gen LVIS_1713 en presencia de diferentes concentraciones de n-butanol.

Se recomienda utilizar las bibliotecas construidas para identificar genes involucrados en la tolerancia a otros inhibidores (etanol, ácido ferúlico, furfural, NaCl, ácido cético, ácido láctico, etc.) presentes en diferentes procesos de fermentación industrial.

BIBLIOGRAFÍA

ATSUMI Shota, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. En Metabolic engineering. 2008, Vol 10, no. 6, p. 305-311.

BEREZINA, Oksana, et al. Reconstructing the clostridial n-butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis*. En Applied microbiology and biotechnology. 2010, Vol 87, no. 2, p: 635-646.

BLATTNER, Frederick, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. En Science. 1997, Vol 277 , no. 5331, p. 1453-1462.

BORDEN, Jacob, y PAPOUTSAKIS, Eleftherios. Dynamics of genomic-library enrichment and identification of solvent tolerance genes for *Clostridium acetobutylicum*. En Applied and environmental microbiology 2007, Vol 73, no. 9, p. 3061-3068.

BOWLES, Linda, y ELLEFSON William. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*". En Applied and environmental microbiology 1985, Vol 50, no. 5, p. 1165-1170.

KNOSHAUG, Eric y ZHANG, Min. Butanol tolerance in a selection of microorganisms. En Applied biochemistry and biotechnology 2009, Vol 153, no. 1-3, p. 13-20.

MAKAROVA K., et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. En Proceedings of the National Academy of Sciences 2006, Vol 103, no. 2, p. 15611-15616.

MANIATIS, Tom, FRITSCH, Edward y SAMBROOK, Joseph. Molecular cloning: a laboratory manual 1982, Vol. 545. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory

PRESCOTT, L et al. Microbiology 2005, 6th. McGrawJHill Higher Education. p: 228 – 338.

REYES, Luis H., ALMARIO, María y KAO, Katy. C. Genomic library screens for genes involved in n-butanol tolerance in Escherichia coli. En PLoS One 6 2011, no. 3, p. e17678.

VOLLHERBST-SCHNECK Kathryn., SANDS J. A. y MONTENERCOURT B. "Effect of butanol on lipid composition and fluidity of Clostridium acetobutylicum ATCC 824". En Applied and environmental microbiology 1984, Vol 47, no. 1, p. 193-194.

WINKLER, James y KAO, Katy. Transcriptional analysis of Lactobacillus brevis to N-butanol and ferulic acid stress responses. En PloS one 6 2011, no. 8, p. e21438.

CITAS BIBLIORGÁFICAS

1. Parikka, M. (2004). Global biomass fuel resources. *Biomass and Bioenergy*, 27(6), 613-620.
2. Geyer, L. L., Chong, P., & Hxue, B. (2007). Ethanol, Biomass, Biofuels and Energy: A Profile and Overview. *Drake J. Agric. L.*, 12, 61.
3. Jin, C., Yao, M., Liu, H., Lee, C. F. F., & Ji, J. (2011). Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(8), 4080-4106.
4. Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological reviews*, 50(4), 484.
5. Papoutsakis, E. T. (2008). Engineering solventogenic clostridia. *Current opinion in biotechnology*, 19(5), 420-429.
6. Atsumi, S., & Liao, J. C. (2008). Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*, 19(5), 414-419.
7. Atsumi, S., Cann, A. F., Connor, M. R., Shen, C. R., Smith, K. M., Brynildsen, M. P., ... & Liao, J. C. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metabolic engineering*, 10(6), 305-311.
8. Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
9. Knoshaug, E. P., & Zhang, M. (2009). Butanol tolerance in a selection of microorganisms. *Applied biochemistry and biotechnology*, 153(1-3), 13-20.
10. Guo, W., Jia, W., Li, Y., & Chen, S. (2010). Performances of *Lactobacillus brevis* for producing lactic acid from hydrolysate of lignocellulosics. *Applied biochemistry and biotechnology*, 161(1-8), 124-136.

11. Kim, J. H., Shoemaker, S. P., & Mills, D. A. (2009). Relaxed control of sugar utilization in *Lactobacillus brevis*. *Microbiology*, 155(4), 1351-1359.
12. Berezina, O. V., Zakharova, N. V., Brandt, A., Yarotsky, S. V., Schwarz, W. H., & Zverlov, V. V. (2010). Reconstructing the clostridial n-butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 635-646.
13. Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of bacteriology*, 189(4), 1199-1208.
14. Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A., & Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS microbiology reviews*, 29(3), 393-409
15. Wei, M. Q., Rush, C. M., Norman, J. M., Hafner, L. M., Epping, R. J., & Timms, P. (1995). An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation. *Journal of microbiological methods*, 21(1), 97-109.
16. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning.
17. Watson, J. D. (2007). Recombinant DNA: genes and genomes: a short course. Macmillan.
18. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic escherichia coli. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.
19. Riley, M., Abe, T., Arnaud, M. B., Berlyn, M. K., Blattner, F. R., Chaudhuri, R. R., ... & Wanner, B. L. (2006). Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation snapshot—2005. *Nucleic acids research*, 34(1), 1-9.
20. Fischbach, M. A., & Walsh, C. T. (2006). Biochemistry: directing biosynthesis. *Science*, 314(5799), 603-5.
21. Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., ... & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *science*, 277(5331), 1453-1462.
22. Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2005). Microbiology, 6th. McGrawHill Higher Education. Pag: 228 – 338.

23. Rabinow, P. (1996). *Making PCR: A story of biotechnology*. University of Chicago Press.
24. Beese, L. S., & Steitz, T. A. (1991). Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *The EMBO Journal*, 10(1), 25
25. Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vol. 545). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
26. Biolabs, New England (2014). *Catalog*, [En línea]: <<https://www.neb.com>>.
27. Pfeleiderer, G., Baier, M., Mondorf, A. W., Stefanescu, T., Scherberich, J. E., & Müller, H. (1980). Change in alkaline phosphatase isoenzyme pattern in urine as possible marker for renal disease. *Kidney international*, 17(2).
28. Engler, M. J., & Richardson, C. C. (1982). 1 DNA Ligases. *The enzymes*, 15, 3-29.
29. Nishimura, A. A., Morita, M., Nishimura, Y., & Sugino, Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. *Nucleic Acids Research*, 18(20), 6169.
30. Weaver, J. C., & Chizmadzhev, Y. A. (1996). Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 41(2), 135-160.
31. Nicholl, D. S. (1994). *An introduction to genetic engineering*. Cambridge University Press.
32. Osoegawa, K., Mammoser, A. G., Wu, C., Frengen, E., Zeng, C., Catanese, J. J., & de Jong, P. J. (2001). A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. *Genome research*, 11(3), 483-496.
33. Borden, J. R., & Papoutsakis, E. T. (2007). Dynamics of genomic-library enrichment and identification of solvent tolerance genes for Clostridium acetobutylicum. *Applied and environmental microbiology*, 73(9), 3061-3068.
34. Reyes, L. H., Almario, M. P., & Kao, K. C. (2011). Genomic library screens for genes involved in n-butanol tolerance in Escherichia coli. *PLoS One*, 6(3), e17678.

35. Hood, L., Goldberg, M. L., Reynolds, A. E., Silver, L. M., & Veres, R. C. (2004). *Genetics: from genes to genomes*. Boston: McGraw-Hill Higher Education.
36. Clarke, L., & Carbon, J. (1992). A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. 1976. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24, 179.
37. Woodruff, L., Pandhal, J., Ow, S. Y., Karimpour-Fard, A., Weiss, S. J., Wright, P. C., & Gill, R. T. (2013). Genome-scale identification and characterization of ethanol tolerance genes in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 15, 124-133.
38. Hong, M. E., Lee, K. S., Yu, B. J., Sung, Y. J., Park, S. M., Koo, H. M., ... & Jin, Y. S. (2010). Identification of gene targets eliciting improved alcohol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering. *Journal of biotechnology*, 149(1), 52-59.
39. Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., ... & Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15611-15616.
40. Bowles, L. K., & Ellefson, W. L. (1985). Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and environmental microbiology*, 50(5), 1165-1170.
41. Vollherbst-Schneck, K., Sands, J. A., & Montenecourt, B. S. (1984). Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and environmental microbiology*, 47(1), 193-194.
42. Winkler, J., & Kao, K. C. (2011). Transcriptional analysis of *Lactobacillus brevis* to N-butanol and ferulic acid stress responses. *PloS one*, 6(8), e21438.
43. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
44. Orr, H. A. (2009). Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature Reviews Genetics*, 10(8), 531-539.
45. Price Evans, D. A. (1989). N-acetyltransferase. *Pharmacology & therapeutics*, 42(2), 157-234.

46. Martins, M., Rodrigues-Lima, F., Dairou, J., Lamouri, A., Malagnac, F., Silar, P., & Dupret, J. M. (2009). An Acetyltransferase Conferring Tolerance to Toxic Aromatic Amine Chemicals molecular and functional studies. *Journal of biological chemistry*, 284(28), 18726-18733.
47. Du, X., & Takagi, H. (2007). N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(6), 1343-1351.
48. Siehl, D. L., Castle, L. A., Gorton, R., Chen, Y. H., Bertain, S., Cho, H. J., ... & Lassner, M. W. (2005). Evolution of a microbial acetyltransferase for modification of glyphosate: a novel tolerance strategy. *Pest management science*, 61(3), 235-240.
49. Du, X., & Takagi, H. (2005). N-Acetyltransferase Mpr1 confers freeze tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Journal of biochemistry*, 138(4), 391-397.
50. Aaij, C., & Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 269(2), 192-200.
51. Hansen, L. H., Knudsen, S., & Sørensen, S. J. (1998). The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Current microbiology*, 36(6), 341-347.
52. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Fragmentation of DNA by sonication. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(4), pdb-prot4538.

ANEXOS

ANEXO A. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

A continuación se muestran las composiciones de los medios de cultivo utilizados. Los platos de agar LB fueron preparados con las mismas composiciones del medio líquido solo que en este caso, se añadió la correspondiente cantidad de agar al medio. Todos los medios fueron esterilizados y se prepararon utilizando agua como solvente [25].

Composición del medio rico en nutrientes Luria Bertani (LB)

10 g/L Bacto-triptona

5 g/L extracto de levadura

5 g/L NaCl

*15 g/L Bacto-agar (En el caso de que se preparen platos de agar)

Composición del medio mínimo M9

30 g/L Na₂HPO₄

15 g/L KH₂PO₄

5 g/L NH₄Cl

2.5 g/L NaCl

15 mg/L CaCl₂

Composición medio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*): Este medio tiene las mismas composiciones del medio LB solo que se suplementa con glucosa con el fin de reparar la membrana de las células electrocompetentes luego de una electroporación.

10 g/L Bacto-triptona

5 g/L extracto de levadura

5 g/L NaCl

20 mM glucosa

ANEXO B. PROTOCOLOS UTILIZADOS EN LA CONSTRUCCIÓN DE LAS BIBLIOTECAS GENÓMICAS

Protocolo para la digestión y desfosforilación del plásmido pYG2

1. Disolver el plásmido a una concentración 1X de CutSmart™ Buffer (NEB) (utilizar agua de grado biomolecular).
2. Añadir la cantidad de enzima *SmaI* (NEB) necesaria: 10 unidades/μg ADN
3. Incubar por 1-16 horas a 25°C.
4. Para desfosforilar el vector digerido, añadir 1uL de *Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)* (NEB) por cada 50 uL de reacción de digestión.
5. Incubar por 30 min a 37 ° C.
6. Purificar los productos de la reacción usando “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega).

Protocolo para reparar terminales de ADN usando *T4 DNA polymerase*

1. Disolver los fragmentos de ADN en 1X NEBuffer2 (NEB) suplementada con 100 μM de cada dNTP (utilizar agua de grado biomolecular).
2. Añadir 1 unidad de T4 DNA Polymerase (NEB) por cada microgramo de ADN.
3. Incubar 15 minutos at 12°C.
4. Detener la reacción purificando el ADN utilizando Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Protocolo para la reacción de ligación

1. Medir la concentración de ADN tanto del vector como de los fragmentos a ensamblar utilizando Qubit® 2.0 Fluorometer (Life technologies) (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración ADN antes de las reacciones de ligación.

ADN	Concentración [µg/mL]
pYG2	49.4
1-1.5	101
1.5-2	71.9
2-2.5	49.3

2. Mezclar todos los componentes necesarios en la reacción basados en las indicaciones de los fabricantes (NEB) (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Reacciones de ligación.

Reactivo	1-1.5 Kpb	1.5-2 Kpb	2-2.5 Kpb	Control Negativo
Vector pYG2	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Inserto	9,2 µl	16,03 µl	27,56 µl	-
T4 DNA ligase buffer (10X)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
T4 DNA ligase (400U/µl)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Agua grado biomolecular	150,8 µl	143,97 µl	132,44 µl	160 µl
Volumen total	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Tabla 4. Condiciones generales en las reacciones de ligación realizadas.

Tamaño [Kpb]	Relación Vector: inserto	Concentración final de ADN [µg/mL]
1-1.5	1:9	7.1
1.5-2	1:8	8.2
2-2.5	1:6	9.3

3. Incubar las reacciones ~72 h a 4 ° C.
4. Detener la reacción purificando el ADN utilizando Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Protocolo para preparar células electrocompetentes

Inocular 20 mL de medio LB con 200 μ L de cultivo "overnight" aproximadamente 2 horas a 37 °C con agitación. Una vez el cultivo alcance una densidad óptica de $DO_{600} \sim 0.6$, transferir el cultivo a un tubo para centrifugar. Colocar las células en hielo aproximadamente 30 min con el fin de mantener la fase exponencial de crecimiento. Centrifugar por 10 min a 9000 rpm a 4 °C, decantar el líquido y añadir 20 mL de glicerol al 10% a 4 °C, suspender las células agitando manualmente. Repetir la centrifugación y la decantación. Llenar el tubo con 10 mL de glicerol al 10 %, suspender el cultivo, centrifugar y decantar; añadir 5 ml de glicerol al 10 % suspender y centrifugar nuevamente. Decantar y dejar aproximadamente 1 mL. Suspender las células con el líquido remanente, mantenerlas en hielo y guardarlas a -80 °C.

Protocolo para la electroporación de *E.coli* BW25113

- Derretir las células electrocompetentes en hielo
- Añadir 2 μ L de ADN a 50 μ L de células electrocompetentes.
- Pipetear la mezcla en la cubeta de electroporación fría - 1 mm gap
- Configuración electroporador: Bacteria 1, Cuvette: 1mm gap, Voltaje: 1800 volts
Fuerza del campo: 18kV/cm, C: 25 μ F PC: 200 Ohms.
- Accionar el botón para realizar el choque eléctrico medir constante de tiempo: (~5 msec óptima)
- Suspender las células después del choque en 1 mL de medio SOC.
- Incubar a 37°C por 1 hora.
- Concentrar las células a un volumen de ~200 μ L y sembrarlas en los platos de agar selectivos.
- Incubar los platos sembrados durante ~12 horas a 37 °C.

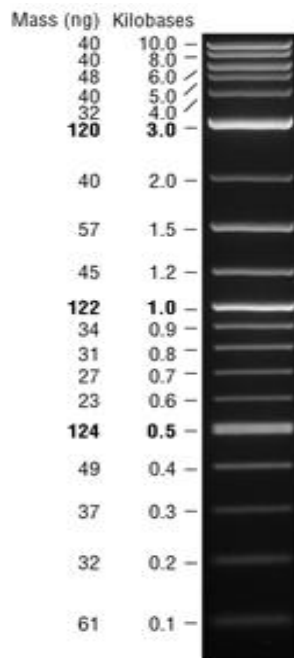
ANEXO C. PCR DE COLONIA

El PCR de colonia consiste en una estrategia para verificar presencia de la secuencia nucleotídica de un fragmento de interés utilizando el ADN de una colonia como modelo. Para las verificaciones de la biblioteca construida se utilizó la enzima *Taq polimerase* (NEB) en GoTaq® Green Master Mix (Promega) y los iniciadores pYG2_f (5'-TTA TCG ACT GCA CGG TGC-3') y pYG2_r (5'-TCA TCC GCC AAA ACA GCC-3'), alineados 200 pb arriba y 200 pb abajo del sitio *SmaI* en el plásmido pYG2. Se realizaron 29 ciclos en el termociclador "C10000 Thermal cycler" (BIO-RAD): Desnaturalización inicial por 30 segundos a 98 °C, alineamiento por 20 segundos a 67.5 °C y extensión por 30 segundos a 72 C.

ANEXO D. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA Y LA GUÍA 2-LOG LADDER.

La electroforesis es una técnica que permite la separación de moléculas cargadas mediante la acción de un campo eléctrico en una matriz de gel de agarosa. En este proceso las moléculas más grandes pasan con mayor dificultad a través de la matriz, de esta forma se pueden diferenciar los tamaños mediante la visualización del gel luego de la acción del campo eléctrico [50]. Generalmente se prepara el gel de agarosa con bromuro de etidio para resaltar la visualización de las moléculas de ADN bajo la acción de radiación UV [50]. En este trabajo se utilizó el equipo “Gel Doc system” (BIO-RAD) para visualizar los geles de agarosa luego de la electroforesis en el equipo “Mupid exu Electrophoresis system” (MUPID). Para poder conocer el tamaño de las moléculas se utilizó la guía 2-Log ladder (NEB) que permite diferenciar los tamaños de las moléculas de ADN de acuerdo a su posición en el gel (Figura 13).

Figura 13. Guía 2 Log-ladder.



Fuente: New England Biolabs [26].

ANEXO E. FOTOGRAFIAS PRINCIPALES EQUIPOS UTILIZADOS.



Digital Sonifier (BRANSON)



**Mupid exu
Electrophoresis system
(MUPID)**



Gel Doc system (BIO-RAD)



**C10000 Thermal cycler
(BIO-RAD)**



**Gene PulserMXcell Electroporation System
(BIO-RAD)**