



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**INGENIERÍA GENÉTICA DE LEVADURA Y SU APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA
PARA BIORREMEDIACIÓN DE MERCURIO**

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el Título Profesional de
Licenciada en Biología

Autora:

Fuentes Rivera Navarro, Jessica Paola

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurado:

Bohorquez Meza, Isabel Doris

Mayanga Herrera, Ana

Rodrigo Rojas, Maria Elena

Lima - Perú

2021



Referencia:

Fuentes, J. (2021). *Ingeniería genética de levadura y su aplicación biotecnológica para biorremediación de mercurio* [Trabajo de suficiencia profesional, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5603>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

INGENIERÍA GENÉTICA DE LEVADURA Y SU APLICACIÓN
BIOTECNOLÓGICA PARA BIORREMEDIACIÓN DE
MERCURIO

Línea de investigación:
Genética, bioquímica y biotecnología
Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el Título Profesional de
Licenciada en Biología

Autor(a)
Fuentes Rivera Navarro, Jessica Paola

Asesor(a)
Salas Asencios, Ramsés
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurado
Bohorquez Meza, Isabel Doris
Mayanga Herrera, Ana
Rodrigo Rojas, Maria Elena

Lima - Perú
2021

Agradecimientos

A Dios por la vida y por iluminar cada paso durante mi camino.

A mi familia por el apoyo incondicional desde siempre.

A la Profesora Dra. Elisabete José Vicente, jefa del laboratorio de Genética de Microorganismo perteneciente al Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas II de la Universidad de São Paulo, por la acogida, confianza y asesoría científica durante el tiempo que permanecí en su laboratorio.

A la Profesora Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg por la atención y colaboración científica durante el desarrollo de los proyectos de investigación.

Al Profesor Mg. Ramsés Salas Asencios por el soporte y asesoría de este trabajo.

ÍNDICE

Resumen.....	4
Abstract.....	5
I. Introducción.....	6
1.1 Trayectoria del Autor	6
1.2 Descripción de la Empresa.....	7
1.3 Organigrama de la Empresa.....	8
1.4 Áreas y Funciones desempeñadas.....	8
II. Descripción de una Actividad Específica.....	10
2.1. Introducción	10
2.2 Marco Teórico	11
2.2.1 Contaminación ambiental por metales pesados tóxicos	11
2.2.2 Mercurio como Contaminante Ambiental	13
2.2.3 Toxicidad del Mercurio	15
2.2.4 Biorremediación de ambientes contaminados por metales pesados tóxicos	16
2.2.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.3 Actividades desarrolladas sobre Ingeniería genética en levadura y su aplicación biotecnológica para Biorremediación de Mercurio	28
2.3.1 Construcción de un sistema de anclaje de proteína heteróloga en la superficie celular de <i>S. cerevisiae</i>	28
2.3.2 Construcción de una cepa de levadura diseñada para la biorremediación de mercurio	35
III. Aportes destacables a la empresa/institución	43
IV. Conclusiones.....	44
V. Recomendaciones	45
VI. Referencias	46

Resumen

El objetivo del presente informe es presentar una revisión respecto a la ingeniería genética realizada en levadura y su aplicación biotecnológica para biorremediación de mercurio. Los organismos vivos están expuestos a niveles tóxicos de iones metálicos provenientes principalmente de actividades antropogénicas, las cuales producen y descargan residuos conteniendo diferentes metales pesados en el medio ambiente. El mercurio es uno de los metales pesados más tóxico, incluso en bajísimas concentraciones, al igual que otros metales tóxicos es difícil de eliminarlo del medio ambiente, ya que no puede degradarse química o biológicamente. Por consiguiente, la contaminación por mercurio es uno de los principales problemas ambientales y de riesgo para la salud humana. En las últimas décadas con los avances en biotecnología, la biorremediación utiliza microorganismos como biosorbentes para la remoción de metales pesados tóxicos de efluentes o aguas residuales industriales. Entre los biosorbentes, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo útil porque se puede cultivar fácilmente en un medio de cultivo de bajo costo, la biomasa es fácilmente obtenida a partir de industrias de fermentación y se puede manipular fácilmente a nivel molecular. Asimismo, la ingeniería genética es una herramienta atractiva para mejorar la adsorción de iones metálicos en levaduras, facilitando de esta forma la remoción de metales pesados tóxicos que contaminan el medio ambiente.

Palabras claves: mercurio, biorremediación, *Saccharomyces cerevisiae*, biosorción.

Abstract

The aim of this work is to present a review on the genetic engineering performed in yeast and its biotechnology application for mercury bioremediation. Living organisms are exposed to toxic levels of metal ions mainly coming from anthropogenic activities, which produce and discharge wastes containing different heavy metals into the environment. Mercury is one of the most toxic heavy metals, even in lower concentrations, like other toxic metals, is difficult to remove from the environment, because it cannot be chemically or biologically degraded. Consequently, mercury contamination is one of the most serious environmental and human health risk problems. In the last decades with the advances in biotechnology, bioremediation uses microorganisms as biosorbents for the removal of heavy metals from wastewater. Among the biosorbents for heavy metal removal *Saccharomyces cerevisiae* is a useful organism because is easily cultivated using cheap media, biomass is easier to get from fermentation industry and is easily manipulated at molecular level. Furthermore, genetic engineering is an attractive tool to improve the adsorption of metal ions in yeast, thus facilitating the removal of toxic heavy metals that pollute the environment.

Keys words: mercury, bioremediation, *Saccharomyces cerevisiae*, biosorption.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Trayectoria del Autor

Realicé mis estudios de pregrado en la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencia Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, obteniendo el grado de Bachiller en Biología. Asimismo, realice mis estudios de posgrado en la Universidad de São Paulo (Brasil) obteniendo el título de Magister en Biotecnología y Doctora en Ciencias.

Durante mi trayectoria profesional adquirí experiencia en el área de microbiología, biología molecular e ingeniería genética de microorganismos, con manejo de técnicas y procedimientos de biología molecular y microbiología aplicada a la biotecnología.

De febrero del 2004 hasta febrero del 2013 trabajé en el laboratorio de Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología de la Universidad de São Paulo (USP), en proyectos de ingeniería genética de bacterias y levaduras para aplicaciones biotecnológicas, los cuales fueron financiados por la compañía minera VALE. Además, participé activamente en el entrenamiento técnico y científico de estudiantes de pre grado.

De diciembre del 2013 hasta noviembre del 2017 pasé a formar parte del equipo de investigadores del laboratorio de Biotecnología del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de São Paulo, trabajando en proyectos de recuperación de áreas contaminadas por metales tóxicos y extracción de cobre a partir de residuos mineros utilizando procesos biotecnológicos.

El informe desarrollado en este trabajo estará enfocado en presentar la actividad realizada en el laboratorio de Genética de Microorganismo de la Universidad de São Paulo referente a la “Ingeniería genética de levadura y su aplicación biotecnológica para biorremediación de mercurio”. En las últimas décadas, las actividades antropogénicas han propiciado el aumento de la acumulación de metales pesados en el medio ambiente, entre ellos

el mercurio, arsénico, plomo, entre otros. Bajo ese contexto, la biorremediación es una alternativa para la remoción de los metales pesados acumulados en el medio ambiente, especialmente el mercurio, el cual es altamente tóxico para el ambiente y la salud de la población. Asimismo, la ingeniería genética es una herramienta utilizada en procesos de biorremediación de mercurio, con la finalidad de mejorar la adsorción de este ion metálico en microorganismos como levaduras, facilitando la reducción de mercurio en el medio ambiente.

1.2 Descripción de la Empresa

El laboratorio de Genética de Microorganismos forma parte del Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de São Paulo. El Departamento de Microbiología está localizado en el campus de la Ciudad Universitaria, en la ciudad de São Paulo (Brasil). Presenta una excelente infraestructura de laboratorios y de enseñanza, desarrolla investigaciones científicas y forma especialistas en diferentes áreas de Microbiología desde 1970. Además de las actividades de investigación, el Departamento está comprometido con la formación y capacitación de profesionales altamente calificados.

El laboratorio de Genética de Microorganismos lleva a cabo investigaciones biotecnológicas sobre levaduras y bacterias, con el objetivo de generar cepas mejoradas para diversas aplicaciones como producción de alcohol utilizando cepas de levaduras modificadas genéticamente, producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por bacterias y biorremediación de metales tóxicos de los efluentes utilizando microorganismos modificados genéticamente.

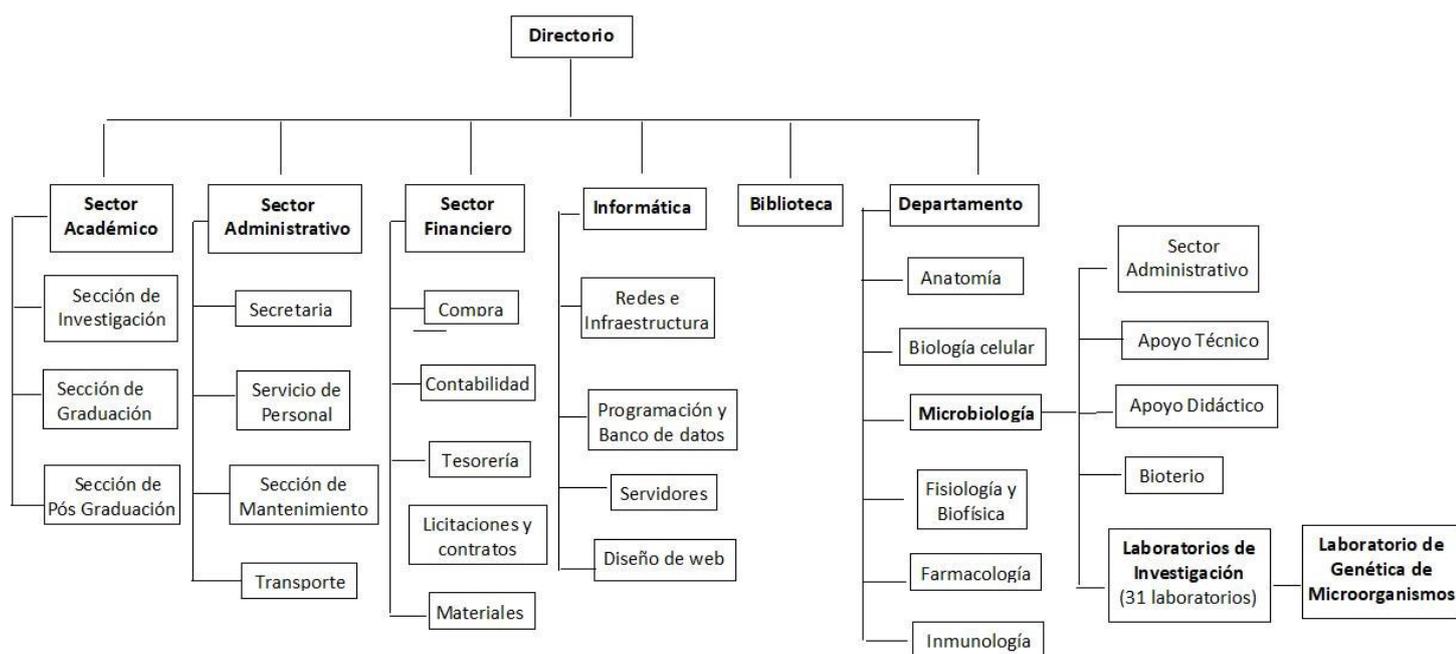
1.3 Organigrama de la Empresa

El Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas II de la USP está constituido por 31 laboratorios de investigación, el sector administrativo, el sector de apoyo técnico, didáctico y un bioterio para el mantenimiento de animales en experimentación (Figura 1).

Figura 1

Organigrama del Instituto de Ciencias Biomédicas II - Laboratorio de Genética de microorganismos

Instituto de Ciencias Biomédicas



1.4 Áreas y Funciones desempeñadas

El laboratorio desarrolla investigaciones y estudios con proyectos aprobados y financiados por diferentes agencias de fomento brasilero, además de la captación de recursos de instituciones privadas.

Las áreas de investigación del Laboratorio de Genética de Microorganismos son las siguientes:

- Biorremediación de aguas contaminadas por metales pesados

Objetivo: Construcción de bacterias y levaduras recombinantes con capacidad aumentada de realizar la biorremediación de agua contaminada por metales pesados tóxicos.

- Expresión de proteínas heterólogas en levaduras

Objetivo: Clonación y expresión de proteínas de interés biotecnológico en levaduras, con el fin de mejorar de la producción de bioproductos como enzimas hidrolíticas, antígenos antivirales, hormonas de crecimiento, etc.

- Desarrollo de bioprocesos y bioproductos:

Objetivo: Producir de forma más eficiente de polihidroxialcanoatos (PHA), que son biopolímeros bacterianos, termoplásticos, biodegradables y de gran interés comercial. Aislamiento de nuevas cepas de bacterias productoras de PHA, capaces de producir: nuevos tipos de biopolímeros y/o biopolímeros a partir de sustratos alternativos derivados de residuos de la agroindustria.

Las principales funciones que desempeñé en el laboratotio fueron:

- Ejecución de proyectos de investigación en el área de genética molecular de levaduras y bacterias, referidos a la construcción de cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* desarrolladas para aplicación biotecnológica.
- Colaboración en la formación técnico-científica de estudiantes de posgrado.
- Análisis de datos y elaboración de informes técnico-científico.
- Participación en la búsqueda y redacción de patentes.

II. DESCRIPCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

Esta sección tiene como objetivo presentar el trabajo realizado en el laboratorio de Genética de Microorganismo titulado:

“INGENIERÍA GENÉTICA DE LEVADURA Y SU APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA PARA BIORREMEDIACIÓN DE MERCURIO”

2.1. Introducción

Las actividades antropogénicas como actividades industriales, agrícolas, disposición de aguas residuales industriales o efluentes, entre otras, son las principales responsables de la contaminación del medio ambiente por metales pesados tóxicos. Los residuos de metales pesados tóxicos han sido desechados de forma indiscriminada en cuerpos de agua o depositados en el suelo.

Uno de los metales pesados que más afectan al ecosistema y a la salud de la vida humana es el mercurio. Los efectos tóxicos del mercurio en la salud se evidencian por un retraso en el desarrollo neurológico en fetos y niños, además de provocar daños en el sistema nervioso central de adultos. Por otro lado, las emisiones de mercurio elemental a la atmósfera, bajo la forma de vapor pueden ser inhaladas y depositadas en los pulmones causando efectos negativos en la salud humana. Uno de los casos más graves de envenenamiento por mercurio ocurrió en la Bahía Minamata, Japón, donde miles de personas que consumieron pescado contaminado con mercurio murieron y otras miles resultaron afectadas (Harada, 1985).

El mercurio es un metal pesado difícil de remover completamente del medio ambiente porque no puede ser degradado química o biológicamente. En este contexto, la expansión de nuevas tecnologías ha llevado a la evolución de la biorremediación como una herramienta

alternativa para reducir las consecuencias adversas de la enorme acumulación de metales pesados en el medio ambiente.

La ingeniería genética es utilizada en procesos de biorremediación para mejorar las funciones específicas de los microorganismos empleados, como biosorbentes, en este proceso, facilitando la descontaminación de ambientes poluidos por metales pesados tóxicos.

El objetivo del presente informe es presentar una revisión respecto a la Ingeniería genética realizada en levadura y su aplicación biotecnológica para Biorremediación de Mercurio.

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Contaminación ambiental por metales pesados tóxicos

Los metales pesados son descargados en la atmósfera, en los ambientes acuáticos y terrestres, alterando el equilibrio de los ecosistemas, incluso en pequeñas concentraciones son una amenaza para el medio ambiente.

Actualmente, el llamado "desecho electrónico" (Residuos de aparatos eléctricos y electrónicos - RAEE), como televisores, celulares, pilas y componentes de informática que acaban siendo descartados y reemplazados por modelos más nuevos y sofisticados, está creciendo asombrosamente. El problema es que tales equipos contienen muchas sustancias peligrosas y tóxicas, principalmente metales pesados, que alcanzan suelos e incluso mantos freáticos, contaminando de esta forma el ambiente y ocasionando serias preocupaciones sobre el manejo de este nuevo tipo de desecho (Babu et al., 2007).

Generalmente se denominan metales pesados aquellos elementos químicos con número atómico mayor que 20 y densidad igual o superior a 5 g/cm^3 . Dentro de este grupo, algunos

iones metálicos son importantísimos para mantener las diversas funciones bioquímicas y fisiológicas en los organismos, cuando se encuentran en concentraciones bajísimas. Sin embargo, algunos metales pesados se pueden convertir en nocivos cuando exceden la concentración límite, convirtiéndose en importantes contaminantes del medio ambiente y su toxicidad es un problema de creciente importancia por razones ecológicas, evolutivas, nutricionales y ambientales (Jaishankar et al., 2014; Nagajyoti et al., 2010).

Los metales pesados comúnmente encontrados en aguas residuales incluyen arsénico (As^{3+} y As^{5+}), cadmio (Cd^{2+}), cromo (Cr^{2+}), cobre (Cu^{2+}), plomo (Pb^{2+}), mercurio (Hg^{2+}) y níquel (Ni^{2+}), todos los cuales causan riesgos para la salud humana y el medio ambiente (Lambert et al., 2000). Los metales pesados ingresan al entorno por medios naturales y actividades humanas. Por lo general, algunos metales pesados tienen más de un estado de oxidación que pueden determinar su movilidad, biodisponibilidad y toxicidad. Ante esta situación, estos metales son tóxicos o pasan a ser tóxicos en determinada concentración o situación y pueden ser considerados metales pesados tóxicos. La acción directa de los metales pesados tóxicos sobre los seres vivos sucede como resultado del bloqueo de actividades biológicas, específicamente por la inactivación enzimática, debido a la formación de enlaces entre el metal y algunos grupos funcionales de proteínas, causando daños irreversibles en diversos organismos (Vullo, 2003).

Las características tóxicas de los metales pesados son las siguientes: (1) pueden permanecer por un largo período de tiempo en la naturaleza; (2) en un determinado ambiente, algunos metales pesados pueden transformarse en especies más tóxicas, a partir de especies menos tóxicas; (3) la bioacumulación y biomagnificación de los metales pesados tóxicos en la cadena alimenticia pueden perjudicar la actividad fisiológica y consecuentemente poner en riesgo la vida humana; (4) algunos metales pesados como mercurio, cadmio, arsénico, entre

otros, son muy tóxicos, incluso en concentraciones bajas. (Alkorta et al., 2004; Volesky, 1990a; Wang y Chen, 2006).

2.2.2 Mercurio como Contaminante Ambiental

El mercurio se presenta en estado líquido a temperatura de ambiente, presenta coloración plateada y su abreviatura “Hg” viene del latín *Hydrargyrum* (plata líquida). Es un metal pesado y tóxico, inclusive en bajísimas concentraciones. Una vez liberado a partir de fuentes naturales o antrópicas y emitido a la biosfera, el mercurio puede cambiar de estado y especie, pero no desaparece como metal, además presenta una gran movilidad en los ecosistemas, y puede entrar a la cadena trófica o alimenticia. Las principales especies de mercurio son el mercurio elemental o metálico (Hg^0), y las especies orgánicas e inorgánicas.

El mercurio elemental (Hg^0) es volátil y es una especie química estable en la atmósfera, de esta forma el vapor de mercurio puede ser transportado en escala global afectando áreas naturales remotas, lejos de las fuentes puntuales de contaminación. Los compuestos inorgánicos de mercurio, también llamados sales de mercurio, se forman a partir de la combinación de iones mercurioso (Hg^+) y mercúrico (Hg^{2+}) con elementos como cloro, azufre y oxígeno (United Nations Environment Program [UNEP], 2002).

En su forma orgánica, el ion mercúrico (Hg^{2+}) se encuentra covalentemente unido al carbono, formando compuestos orgánicos llamados organomercuriales. Entre los compuestos orgánicos de mercurio tenemos: metilmercurio, dimetilmercurio, fenilmercurio y etilmercurio, siendo el metilmercurio (CH_3Hg) y el dimetilmercurio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) los más comunes en el medio ambiente (UNEP, 2002, 2013). La contaminación de ambientes acuáticos por mercurio está asociada, especialmente, a la posibilidad de metilación de su forma inorgánica (Hg^{2+}) por bacterias, que posibilitan el mantenimiento de concentraciones relativamente elevadas en los

cuerpos de agua y el acceso preferente a la biota. El metilmercurio por ser liposoluble es bastante absorbido por las membranas biológicas, así como por los tractos digestivos de prácticamente todas las cadenas alimenticias. Estos procesos facilitan la permanencia y el transporte del mercurio en el medio acuático, así como la transferencia de la contaminación para ecosistemas bastante alejados de la fuente de contaminación, promoviendo la aceleración de la bioacumulación en la cadena alimenticia y la maximización de los riesgos en los ecosistemas naturales y en la salud humana (Porcella, 1994).

El mercurio, además de ser altamente tóxico, es capaz de sufrir biomagnificación en casi todas las cadenas alimenticias es decir, su concentración aumenta conforme aumenta el nivel trófico de la especie (UNEP, 2002). Esto resulta en una exposición ambiental bastante alta para los consumidores de niveles tróficos superiores, incluyendo el hombre. Comparando la concentración de metilmercurio (CH_3Hg) en el agua, en relación a la encontrada en lo alto de la cadena trófica, el factor de biomagnificación del mercurio está en la orden de 1 millón de veces (Castoldi et al., 2003; Clarkson, 1997, 2002) .

Con el pasar de los años, los problemas con mercurio aumentaron debido a la contaminación ambiental generada por las actividades humanas asociadas a los yacimientos de oro, quema de combustibles fósiles, producción de cloro-soda, empleo de fungicidas mercuriales, fabricación de lámparas fluorescentes; con consecuente liberación de mercurio para los sistemas atmosféricos, acuáticos y terrestres.

En el Perú, principalmente en la región Amazónica, grandes cantidades de mercurio son utilizados para la formación de amalgama durante la extracción de oro de forma ilegal e informal. Después de la utilización en el proceso de extracción de oro, el mercurio residual es descartado en las márgenes de los ríos y suelos, o eliminado a la atmosfera como vapor durante el proceso de quema de amalgama, el cual puede ser oxidado y retornar a los ecosistemas

terrestres a través de las precipitaciones. Estando disponible en los cuerpos de agua, el mercurio puede transformarse en metilmercurio y entrar en la cadena alimenticia de organismos acuáticos, como por ejemplo peces, los cuales son uno de los mayores bioconcentradores de este metal (De Souza y Barbosa, 2000). En el caso de Madre de Dios, la minería informal e ilegal ha llevado a niveles críticos de contaminación y de impacto negativo al ecosistema, con el peligro de extender la contaminación hacia grandes extensiones de bosques tropicales aledaños, con una gran acumulación de este metal en suelos, agua y por ende, en organismos vivos que viven en esa zona.

2.2.3 Toxicidad del Mercurio

La toxicidad del mercurio se debe a su fuerte afinidad por el grupo sulfhidrido (-SH) de enzimas y proteínas, causando daños irreversibles a los sistemas biológicos. El mercurio también tiene afinidad, aunque en menor grado, por los grupos carboxilo, amida, amina y fosforilo de enzimas, lo que contribuye para su toxicidad.

Los compuestos organomercuriales son extremadamente tóxicos, no solo para el ser humano, sino también para toda la biota. Debido al radical orgánico, este compuesto puede entrar rápidamente en la corriente sanguínea, causando daños irreparables al sistema nervoso central, afectando principalmente áreas específicas del cerebro, como cerebelo y lóbulos temporales. Una vez en el organismo, el compuesto se convierte rápidamente en un complejo proteico, manteniendo gran movilidad en los tejidos animales. La liposolubilidad de los compuestos organomercuriales también facilita su pasaje a través de los tejidos. Estos compuestos también pueden ser absorbidos por la piel y aproximadamente el 100% por el tracto gastrointestinal.

La intoxicación por metilmercurio se caracteriza por ataxia (pérdida de la coordinación de los

movimientos voluntarios), disartria (problemas en las articulaciones de las palabras), parestesia (pérdida de la sensibilidad en las extremidades de las manos y pies y alrededor de la boca), visión de túnel (constricción del campo visual) y pérdida de la audición. Una contaminación severa puede llevar a la muerte. El metilmercurio puede atravesar también la barrera placentaria en el feto, causando daños serios al desarrollo de este, principalmente a nivel neurológico (Micaroni, 2000).

El mercurio en la forma de vapor (Hg^0) puede atravesar fácilmente la membrana alveolar hasta alcanzar la circulación sanguínea. En la sangre, el mercurio es oxidado a la forma divalente (Hg^{2+}) y es rápidamente distribuido por el cuerpo, pudiendo ligarse a la albumina y a la hemoglobina (Micaroni, 2000).

2.2.4 Biorremediación de ambientes contaminados por metales pesados tóxicos

Varias técnicas fueron usadas para la remoción y/o recuperación de metales pesados tóxicos de ambientes contaminados. Procedimientos como: precipitación, intercambio iónico, adsorción, oxido-reducción, osmosis reversa y tratamiento electroquímico fueron utilizados para la remoción de estos metales de soluciones o efluentes. Sin embargo, la mayoría de estos procesos presentan altos costos, son ineficientes, especialmente para la remoción de bajas concentraciones del metal pesado tóxico, requieren el uso de aditivos químicos y pueden generar flujos de residuos concentrados que deben ser eliminados (Kiyono y Pan-Hou, 2006).

La biorremediación es un proceso que utiliza principalmente microorganismos para reducir, remover, eliminar o transformar en compuestos menos tóxicos, contaminantes peligrosos presentes en ambientes contaminados. La biorremediación tiene varias aplicaciones, incluyendo la descontaminación y recuperación de suelos, aguas subterráneas,

ríos, lagunas, lodo y efluentes (Boopathy, 2000). Asimismo, ofrece varias ventajas: puede ser realizada en el local, generalmente sin causar mayores alteraciones a las actividades cotidianas; es una técnica económicamente viable; los contaminantes se eliminan de forma permanente; es ambientalmente amigable y puede ser acoplada a otros tratamientos físico-químicos (Vidali, 2001).

En las últimas décadas, la biorremediación está siendo aplicada en diferentes tipos de contaminantes como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), trinitrobenzeno (TNT) y bifenilos policlorados (PCBs) (Tabak et al., 2005).

En la actualidad, el proceso de biorremediación también es utilizado para restaurar ambientes contaminados por metales pesados tóxicos, debido a las ventajas mencionadas anteriormente. Al contrario de los contaminantes orgánicos, los metales pesados no pueden ser degradados, permaneciendo en el ambiente por tiempo indefinido. Sin embargo, los microorganismos pueden interactuar con algunos metales pesados tóxicos y transformarlos de una especie química a otra, los cuales pueden ser precipitados o volatilizados en solución (Tabak et al., 2005).

La búsqueda de nuevas estrategias de biorremediación para la remoción de metales tóxicos de ambientes contaminados ha sido direccionada para procesos de biosorción, el cual utiliza microorganismos como biosorbentes, por ejemplo bacterias, levaduras, hongos y algas. Estos microorganismos tienen la propiedad de secuestrar algunos metales disueltos en soluciones y pueden disminuir la concentración de los iones metálicos tóxicos en solución con eficiencia y rapidez. Por consiguiente, la biosorción es una estrategia ideal para tratamiento de efluentes, conteniendo bajas concentraciones de iones metálicos tóxicos (Ledin, 2000; Wang y Chen, 2009; Kuroda y Ueda, 2011).

Hay dos procesos de adsorción de iones metálicos utilizados por los microorganismos para extraerlos a partir de la solución (Figura 2):

- El primero es la bioacumulación que consiste en la captación de iones metálicos por los microorganismos vivos, para ser transportados, a través de la membrana plasmática, para el citoplasma, seguido de su secuestro en un compartimiento celular. Este proceso es dependiente del metabolismo.

Los organismos vivos presentan intrínsecamente mecanismos de homeostasis a metal que mantienen la concentración intracelular de iones metálicos en respuesta a los iones metálicos del ambiente.

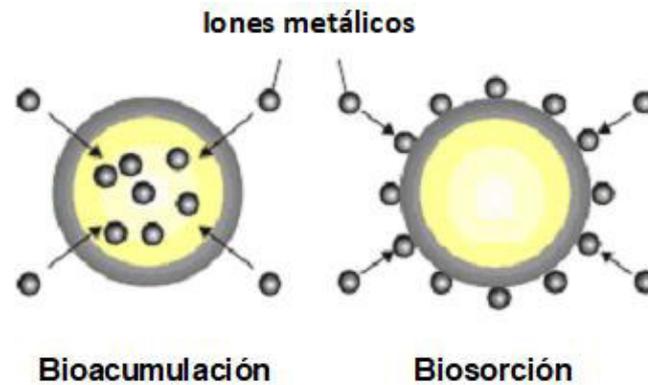
Una vez incorporado el ion metálico al citoplasma, este puede ser secuestrado por proteínas ricas en grupo sulfhidrido llamadas metalotioneinas (MT), fitoquelatinas (PC) y glutatión (GSH), o compartimentalizado dentro de vacuolas (Marrero *et al.*, 2010).

Los iones metálicos acumulados en las células no pueden ser fácilmente recuperados sin disrupción celular y, consecuentemente, la reutilización del biosorbente celular es imposible. Por lo tanto, la acumulación intracelular es limitada para la recuperación de iones metálicos acumulados (Kuroda y Ueda, 2011).

- El segundo proceso es la biosorción que consiste en la ligación de iones metálicos a la superficie celular del microorganismo, a través de interacciones fisicoquímicas entre los iones metálicos y los grupos funcionales presentes en la superficie celular. Este proceso es independiente del metabolismo. La adsorción en la superficie celular es activa en células vivas y muertas; es un proceso rápido porque la superficie celular interactúa con el material circundante. Es importante destacar que, a diferencia de la bioacumulación, no se requiere la ruptura celular para recuperar los iones metálicos adsorbidos en la superficie celular, permitiendo la reutilización del microorganismo en un nuevo proceso de biosorción (Kuroda y Ueda, 2011). De esta forma, la biosorción se muestra como una alternativa para la bioacumulación.

Figura 2

Adsorción de iones metálicos en microorganismos



Nota. Adaptada de “Molecular design of the microbial cell surface toward the recovery of metal ions”, por Kuroda y Ueda, 2011, *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3).

Con el objetivo de mejorar la adsorción de iones metálicos tóxicos en la superficie de microorganismos, la ingeniería genética modificó las propiedades de la superficie celular, al expresar péptidos o proteínas anclados en la superficie externa de la célula que se unen a iones metálicos, (“cell surface display”), utilizando como ancla proteínas nativas de pared celular (Kuroda y Ueda, 2011; Li y Tao, 2015).

En la superficie celular de algunos microorganismos, como *Escherichia coli*, *Cupriavidus metallidurans*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus* y *Saccharomyces cerevisiae*, fueron expresados péptidos o proteínas quelantes de metal para biorremediar aguas contaminadas con metales pesados tóxicos (Kuroda y Ueda, 2011) (Tabla 1).

Tabla 1

Biosorción de iones metálicos por proteínas o péptidos anclados en la superficie celular de microorganismos.

Péptido/Proteína anclado en la superficie celular	Ion metálico	Proteína Ancla	Microorganismo	Referencia
Metalotioneina humana, Metalotioneina de levadura	Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺	LamB	<i>E. coli</i>	Sousa et al., 1998
Péptidos curtos unidos a metal	Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺	LamB	<i>E. coli</i>	Kotrba et al., 1999
Hexa-histidina	Cd ²⁺	LamB	<i>E. coli</i>	Sousa et al., 1996
Fitoquelatina	Cd ²⁺	Lpp-OmpA	<i>E. coli</i>	Bae et al., 2000
MerR	Hg ²⁺	Ice nucleation protein	<i>E. coli</i>	Bae et al., 2003
Proteína que se une a fosfato	H ₂ PO ₄ ⁻	Ice nucleation protein	<i>E. coli</i> <i>P. putida</i>	Li et al., 2009
Variantes de CBD seleccionados	Ni ²⁺	SPA	<i>S. carnosus</i>	Wernerus et al., 2001
Péptidos Poli-histidil	Cd ²⁺ , Ni ²⁺	SPA	<i>S. xylosum</i> , <i>S. carnosus</i>	Samuelson et al., 2000
Metalotioneina de ratón	Cd ²⁺	IgA β-domain	<i>E. coli</i> <i>R. eutropha</i>	Valls et al., 2000
Hexa-histidina	Cu ²⁺ , Ni ²⁺	α-Aglutinina	<i>S. cerevisiae</i>	Kuroda et al., 2001
Metalotioneina de ratón	Cd ²⁺	α-Aglutinina	<i>S. cerevisiae</i>	Kuroda y Ueda, 2003
ModE	Mo ²⁺	α-Aglutinina	<i>S. cerevisiae</i>	Nishitani et al., 2010
Péptido NP co CXXEE	Pb ²⁺	α-Aglutinina	<i>S. cerevisiae</i>	Kotrba y Ruml, 2010

Nota: Adaptada de “Molecular design of the microbial cell surface toward the recovery of metal ions”, por Kuroda y Ueda, 2011, *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3).

Las propiedades de adsorción de los biosorbentes construidos por ingeniería genética van a depender de las características de adsorción del péptido o proteína que se une al metal. Las células pueden ser dotadas con la capacidad de adsorber iones metálicos específicos por el péptido o proteína anclada en su superficie celular externa que puede unirse a iones metálicos específicos (Kuroda y Ueda, 2010).

2.2.5 *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos más estudiados y utilizados en procesos industriales, como producción de alimentos, pan, extracto de levadura, suplemento dietético para la alimentación animal, aroma y sabor de los alimentos, bebidas, glicerina y etanol combustible. Con el surgimiento de la tecnología del ADN recombinante, tanto la levadura *S. cerevisiae* como otras levaduras relacionadas ganaron mayor importancia biotecnológica, debido a su potencial para producir proteínas heterólogas (Walker, 1998).

S. cerevisiae es reconocido por la FDA americana ("Food and Drug Administration ") como un organismo seguro, " GRAS ("Generally Recognized As Safe"), para ser empleado como suplemento nutricional para humanos y animales, no ofreciendo riesgos de contaminación por sustancias tóxicas o alergénicas normalmente presentes en otros microorganismos (Romanos et al., 1992). Esta levadura fue el primer eucariota que tuvo su genoma secuenciado (Goffeau et al., 1996).

Por ser un organismo unicelular, *S. cerevisiae* presenta las mismas facilidades de manipulación y condiciones de crecimiento que las bacterias. Sin embargo, ofrecen también una serie de ventajas adicionales, en lo que se refiere a la producción de proteínas heterólogas, entre ellas: ambiente intracelular favorable para la correcta formación de proteínas; y la capacidad de procesar modificaciones postraduccionales para la producción de proteínas heterólogas, como: glicosilación, acilación y fosforilación (Kukuruzinska et al., 1987; Miyamoto et al., 1985; Towler et al., 1988). Estas características contribuyen al mantenimiento de la integridad estructural, solubilidad, actividad biológica y localización celular de proteínas recombinantes. A partir de la primera publicación mostrando la expresión de un gen heterólogo en *S. cerevisiae* (Hitzeman et al., 1981), ese microorganismo viene siendo empleado frecuentemente como sistema hospedero (Romanos et al., 1992). La extensión y diversidad de productos expresados en este microorganismo son significativas,

variando desde simples enzimas a hormonas, factores de crecimiento, proteínas sanguíneas o estructuras complejas como anticuerpos. De esta forma, los productos obtenidos no están limitados a procesos fermentativos tradicionales, sino que abarcan diversos sectores como alimentos, químicos, enzimáticos, farmacéuticos, agricultura y ambiente (Walker, 1998).

2.2.5.1 *S. cerevisiae* como biosorbente. La biomasa de levaduras fue utilizada como biosorbente para la remoción de iones metálicos como Ag^+ , Au^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , U^{2+} y Zn^{2+} de soluciones acuosas (Tabla 2). Levaduras del género *Saccharomyces* sp., *Candida* sp., y *Picchia* sp., son eficientes biosorbente para la remoción de metales pesados tóxicos. La mayoría de las levaduras pueden adsorber una amplia gama de iones metálicos o ser estrictamente específicas en relación a un ion (Wang y Chen, 2009).

Tabla 2

Biosorción de algunos iones metálicos en *S. cerevisiae*.

Tipo de metal	Metal	Referencias
Metal Tóxico	Pb^{2+}	Goksungur et al., 2005, Özer, Özer, 2003; Suh et al., 1999a,b;
	Cu^{2+}	Bakkaloglu et al. ; 1998; Wang, 2002b
	Zn^{2+}	Bakkaloglu et al., 1998
	Cd^{2+}	Gomes et al., 2002; Park et al., 2003; Vasudevan et al., 2003; Goksungur et al., 2005;
	Hg^{2+}	Al-Saraj et al., 1999; Zhu et al., 2004
	Co^{2+}	Al-Saraj et al. 1999
	Ni^{2+}	Bakkaloglu et al., 1998; Özer, Özer, 2003
	Cr^{3+}	Ferraz et al., 2004; Özer, Özer, 2003; Rapoport, Muter, 1995;
	As^{3+}	Nguyên-nhu, Knoops, 2002
	Metales Preciosos	Pd^{2+}
Pt^{4+}		Xie et al., 2003b
Au^{3+}		Karamushka, Gadd, 1999; Lin et al., 2005
Ag^+		Bustard, McHale, 1998; Simmons, Singleton, 1996
Radionúclidos	U^{2+}	Kedari et al., 2001
	^{241}Am	Liu et al., 2003b
	Sr	Avery, Tobin, 1992
	U^{2+}	Nakajima, 2001; Popa et al., 2003; Riordan et al., 1997
	Se, Sb^{3+}	Pérez-Corona et al., 1997
	U, Sr, Cs	Kapoor, Viraraghavan, 1997

Nota. Tomada de “Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review”, por Wang y Chen, 2006, *Biotechnology Advances*, 24(5).

Cuando la levadura *S. cerevisiae* es incubada en presencia de metal, la pared celular es la primera estructura celular que entra en contacto con los iones metálicos. Inicialmente, la captación de metal por la célula ocurre a través de la interacción con los grupos funcionales presentes en la pared celular, incluyendo fosfato, carboxilo, amina y especies fosfodiéster. (Liu et al., 2002; Volesky, 1990a, b; Wang y Chen, 2006).

Entre las levaduras, *S. cerevisiae* es una de las más empleadas en estudios de biosorción porque presenta características únicas en comparación con otros microorganismos para la remoción de metal. Según Wang y Chen (2006), las ventajas que tornan esta levadura interesante para procesos de biosorción son:

1) Se pueden cultivar en grande escala, pudiendo crecer fácilmente, utilizando técnicas de fermentación no sofisticadas en medio de cultivo de bajo costo;

2) La biomasa de *S. cerevisiae*, como un subproducto, puede obtenerse fácilmente en grandes cantidades, a partir de varias industrias de fermentación (cervecera, de alimentos, producción de etanol combustible), en comparación con otros tipos de biomasa microbiana residual. A diferencia de otras biomásas, las células de levadura obtenidas de industrias de fermentación son estables y no son necesarios tratamientos drásticos asociados a procesos de recuperación de productos primarios. Por ejemplo, la biomasa de hongos utilizada en la industria farmacéutica necesita tratamientos con solventes, que pueden afectar el desempeño de su capacidad de remoción de metal;

3) Como es un organismo GRAS, este hecho aumenta la viabilidad del uso de esta biomasa en procesos de biorremediación.

4) La levadura *S. cerevisiae* fue utilizada como modelo eucariota para investigaciones de biosorción de iones metálicos, incluyendo estudios de interacción microorganismos-iones;

5) La utilización de esta levadura como sistema modelo es particularmente atractiva debido a la fácil manipulación genética y la disponibilidad de la secuencia genómica completa

(Perego y Howell, 1997). Los conocimientos acumulados sobre la biología molecular de esta levadura son útiles para identificar los mecanismos moleculares de biosorción en la remoción de iones metálicos;

6) La característica de floculación presentada por *S. cerevisiae* puede facilitar la separación mecánica al final del proceso de biosorción. Esta propiedad intrínseca hace innecesario el uso de técnicas de inmovilización celular o procesos de separación sólido-líquido (Soares y Soares, 2012).

Todas estas ventajas hacen de la biomasa de levadura una herramienta promisoría en procesos de biorremediación que apuntan a la descontaminación de aguas con metales pesados tóxicos.

2.2.5.2 Sistema de anclaje en la superficie celular “cell surface display” de *S. cerevisiae*. El uso de proteínas nativas de superficie celular como herramienta para anclar proteínas heterólogas presenta varias aplicaciones en las diferentes áreas de la ciencia. Por medio de esta estrategia, varios péptidos o proteínas fueron anclados en la superficie celular de algunos microorganismos para aplicaciones biotecnológicas como producción de anticuerpos, construcción de biocatalizadores, biosorbentes celulares, biosensores, entre otros (Wernerus y Ståhl, 2004).

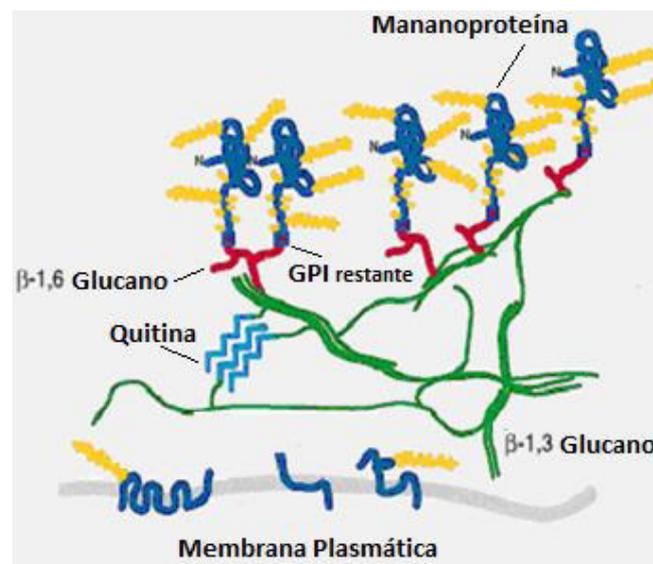
La utilización de esta estrategia permitió la construcción de cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que presentaron proteínas heterólogas, con actividad catalítica, ancladas en su pared celular. Estas cepas fueron llamadas de células de levaduras armadas (“arming yeast cells”) (Kondo y Ueda, 2004; Lee et al., 2003; Schreuder, 1996; Ueda y Tanaka, 2000b; Van der Vaart et al., 1997).

La pared celular de *S. cerevisiae* es una estructura rígida de aproximadamente 200 nm de espesura, está formada por tres componentes principales: (1) glucano forma parte de la capa interna de la pared celular, es un polímero de β -1,3 y β -1,6 de glucosa, que le proporciona rigidez y flexibilidad a la célula; el β -1,3 glucano forma una red fibrosa; y el β -1,6 glucano es ampliamente ramificado; (2) quitina es un polímero N-acetilglucosamina, y está localizada en la capa interna formando un complejo con el β -1,3 glucano; (3) mananoproteínas altamente glucosiladas, están localizadas en la capa externa de la pared celular, otorgándole porosidad (Lipke y Ovalle, 1998).

La pared celular de *Saccharomyces sp.* contiene más de 20 tipos de mananoproteínas que desempeñan diferentes papeles en la construcción, preservación, modificación de la estructura celular e interacción de las células, como por ejemplo, las interacciones intercelulares durante la aglutinación o floculación (Lipke y Ovalle, 1998; Mrsa y Tanner, 1999) (Figura 3).

Figura 3

Componentes estructurales de la pared celular S. cerevisiae



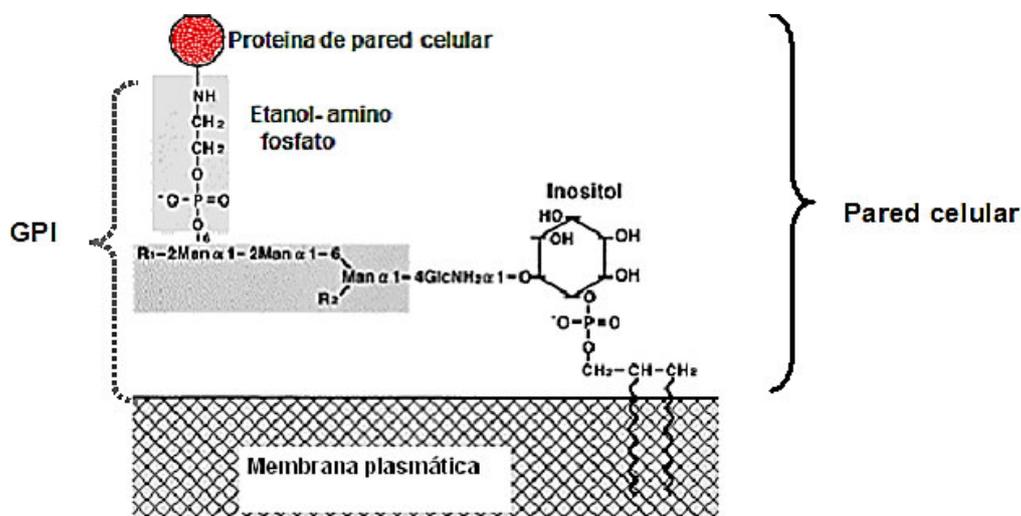
Nota. Adaptada de “Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges”, por Lipke y Ovalle, 1998, *Journal of Bacteriology*, 180(15).

Varias mananoproteínas de *S. cerevisiae*, como: Ag α 1, Aga1, Flo1, Sed1, Cwp1, Cwp2, Tip1, Tir1 / Srp1, presentan en su estructura un dominio de unión a glucosilfosfatidilinositol (GPI). La estructura GPI fue encontrada en varias proteínas de membrana plasmática de eucariotas y es altamente conservada en los diferentes organismos (Ueda y Tanaka, 2000a). La estructura GPI de levaduras está compuesta de: etanol-amino fosfato, manosa (α -1,2), manosa (α -1,6), manosa (α -1,4), glucosamina (GlcN) e inositol -fosfolípido (Figura 4).

La parte glucosilfosfolípida de GPI se une covalentemente a la región C-terminal de las mananoproteínas y su función principal es permitir una asociación estable entre la mananoproteína y la membrana plasmática.

Figura 4

Componentes estructurales de Glucosilfosfatidilinositol (GPI)



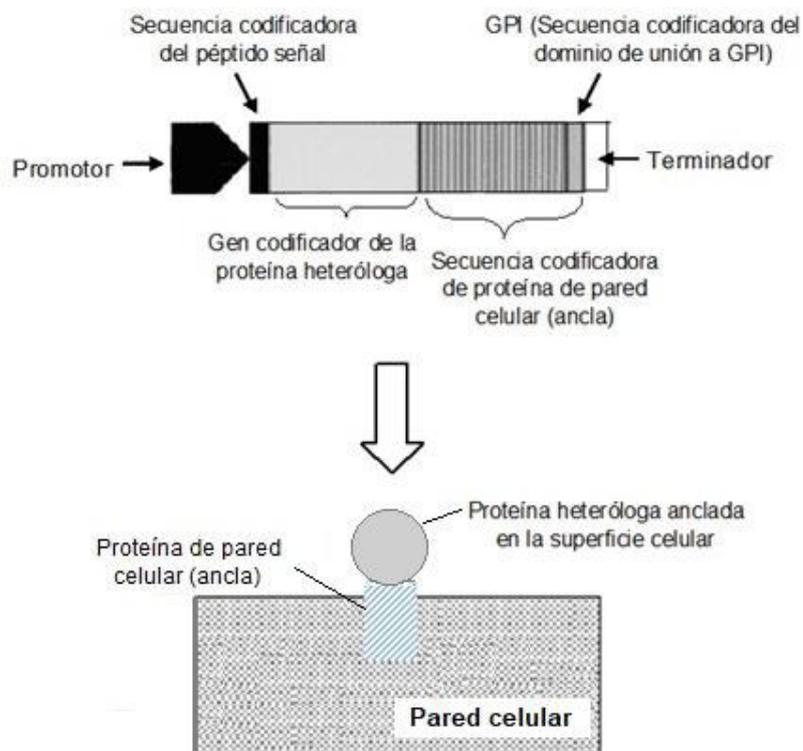
Nota. **Man** (manosa); **GlcNH₂**, glucosamina. Tomada de “Genetic immobilization of protein on the yeast cell surface”, por Ueda y Tanaka, 2000a, *Biotechnology Advances*, 18(2).

La proteína heteróloga es expresada en la superficie celular como una fusión con la proteína de pared celular, utilizada como ancla para inmovilizar la proteína heteróloga.

En los sistemas descritos, el gen codificador de la proteína heteróloga es fusionado: (1) en un extremo a una secuencia codificadora del péptido señal, que direcciona el transporte de la proteína para la superficie celular; y, (2) en el otro extremo a una secuencia codificadora de proteína de pared celular (mananoproteína - ancla), como por ejemplo proteína α -aglutinina, Flo1p, Sed, Cwp2, entre otros (Murai et al., 1997; Nakamura et al., 2001; Ueda y Tanaka, 2000a; Van der Vaart et al., 1997). De esta forma, la proteína heteróloga es transportada y anclada a la superficie celular externa de la levadura *S. cerevisiae* (Kondo y Ueda, 2004) (Figura 5).

Figura 5

Esquema del diseño para la expresión de proteína heteróloga sobre la superficie celular de levadura (“yeast cell surface display”)



Nota. Adaptada de “Yeast cell surface display – Application of molecular display”, por Kondo y Ueda, 2004, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(1).

2.3 Actividades desarrolladas sobre Ingeniería genética en levadura y su aplicación biotecnológica para Biorremediación de Mercurio

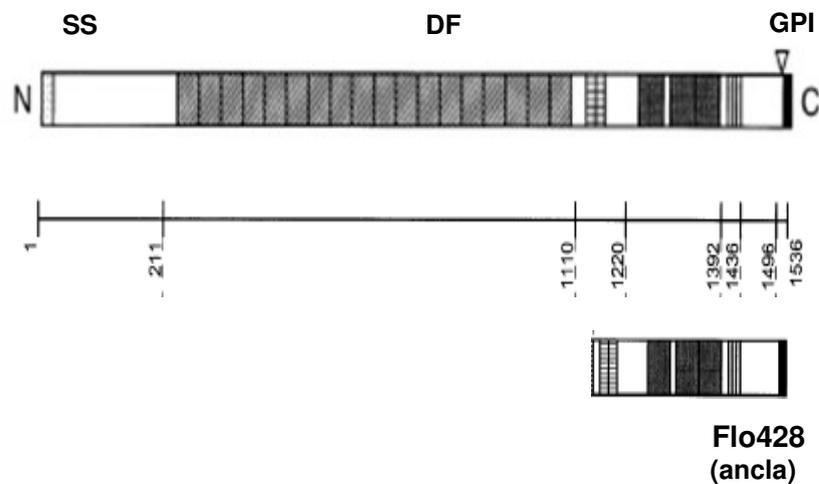
2.3.1 Construcción de un sistema de anclaje de proteína heteróloga en la superficie celular de *S. cerevisiae*

Entre los sistemas de anclaje de proteínas heterólogas en la superficie celular externa de *S. cerevisiae*, se destaca la mananoproteína Flo1p (Murai et al., 1997; Sato et al., 2002) responsable por la floculación (Teunissen et al., 1993). Este fenómeno consiste en la agregación de células en grupos y su posterior extracción del medio de fermentación, por sedimentación.

La proteína Flo1p es codificada por el gen *FLO1*, rica en serina y treonina, y está compuesta por 1536 aminoácidos. Debido al elevado número de posibles sitios de *O* y *N*-glicosilación, Flo1p presenta una conformación extendida, rígida, tipo bastón, atravesando la pared celular y exponiendo la región N-terminal en la superficie celular (Watari et al., 1994). Esta proteína está compuesta por los siguientes dominios: secuencia señal de excreción (presente en la región N-terminal); el dominio funcional de la floculación, que se repite por 18 veces y el dominio de unión a GPI (presente en la región C-terminal), responsable de la unión de esta proteína a la superficie celular (Teunissen et al., 1993, Watari et al., 1994; Sato et al., 2002) (Figura 6).

Figura 6

Esquema de la proteína Flo1p de *S. cerevisiae*



Nota. **SS** - secuencia señal; **DF** - dominio funcional de floculación; **GPI** - dominio de unión a GPI. Tomada de “Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamilase to polymer substrates”, por Sato et al., 2002, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(4).

En trabajos anteriores fue demostrado que el tamaño del ancla influye en la exposición del péptido o proteína heteróloga anclada en la superficie celular de levadura (Sato et al., 2002).

Basado en esta información fue construido un sistema que permitió el anclaje de la proteína glucoamilasa de *Aspergillus awamori* en la superficie de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando como ancla el dominio C-terminal de 428 aminoácidos de la proteína de pared celular Flo1p, denominado como Flo428 (Fuentes Rivera, 2008) (Figura 6). La glucoamilasa representó un marcador directo de selección para *S. cerevisiae* que no produce normalmente amilasas y no es capaz de hidrolizar el almidón directamente; además de ser de gran valor para investigaciones biotecnológicas.

La glucoamilasa de *A. awamori* es una exohidrolasa (α 1,4-D-glucan-glucohidrolasa E.C.3.2.1.3.) que ataca a los enlaces glucosídicos de los extremos no reductores de las cadenas

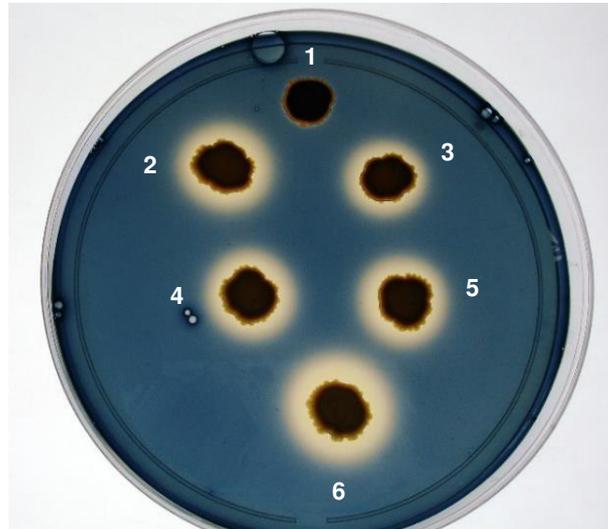
de almidón, liberando moléculas de glucosa. Por lo tanto, el anclaje de glucoamilasa en la pared celular de *S. cerevisiae* puede facilitar la utilización del almidón por la levadura, asimilando la glucosa liberada para proliferar y fermentar (Pavezzi et al., 2008).

Para la construcción del sistema de anclaje en *S. cerevisiae* fue necesario realizar la fusión génica entre el ADNc codificador de la glucoamilasa de *A. awamori* (el cual contiene su secuencia señal de secreción) y la secuencia de ADN codificadora de Flo428, utilizada como ancla. Antes de realizar la fusión génica, fue retirado el codón de terminación de la secuencia codificadora de glucoamilasa, pero se conservó el codón de terminación de la secuencia codificadora de Flo428. De esta forma, la fusión génica “Glucoamilasa-Flo428” (G*-F) sería traducida como una única proteína. La fusión génica fue expresada sobre la regulación del promotor y terminador del gen codificador de la fosfoglicerato quinasa (*PGK*) de *S. cerevisiae*, obteniéndose el casete de expresión y anclaje de glucoamilasa. El casete ladeado en los extremos con el fragmento del gen *CAN1* (codificador de L-canavanina) de *S. cerevisiae*, fue denominado CG*FC y fue utilizado en la transformación genética de la cepa de *S. cerevisiae* YPH252. Las colonias transformantes obtenidas fueron seleccionadas por la adquisición de resistencia a L-canavanina, resultante de la integración del casete CG*FC en el genoma de la levadura. Estas colonias transformante de *S. cerevisiae* fueron denominadas YPH252/CG*FC y se utilizó como control negativo la cepa YPH252 no transformada con el casete CG*FC.

La actividad amilolítica de las colonias transformantes fue detectada por la formación de halos alrededor de estas colonias en medio agar YPDA (conteniendo 0.5% almidón), hecho que no fue observado en la colonia del control negativo (Figura 7). (Fuentes Rivera, 2008).

Figura 7

Ensayo en placa para detección de actividad de la glucoamilasa en las colonias de S. cerevisiae YPH252

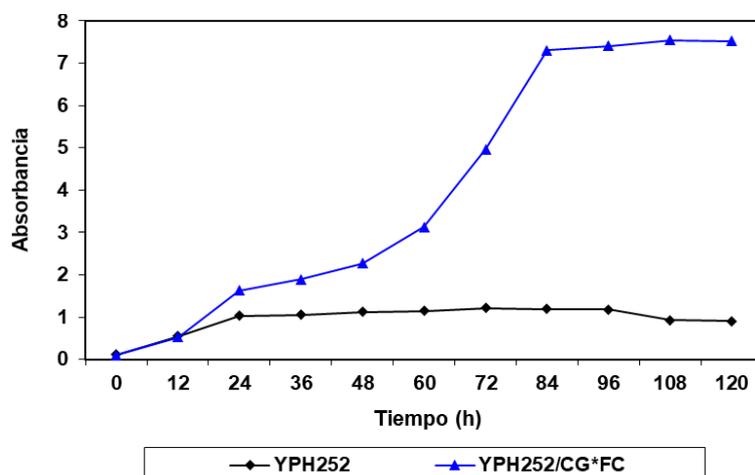


Nota. Colonias da *S. cerevisiae* YPH252 cultivadas en medio agar YPDA (conteniendo 0.5% de almidón) y expuestas a vapor de yodo. La colonia (1) corresponde al control negativo: *S. cerevisiae* YPH252. Las colonias (2, 3, 4, 5 y 6) corresponden a los transformantes obtenidos de *S. cerevisiae* YPH252, denominados YPH252/CG*FC. Tomada de Fuentes Rivera, 2008.

En la figuras 8-A y 8-B se pueden observar que la cepa recombinante YPH252/CG*FC fue capaz de utilizar directamente el almidón como única fuente de carbono para el crecimiento celular, mientras que la cepa original YPH252 (control negativo) presentó una velocidad de crecimiento reducida, debido a la incapacidad de esta para degradar almidón. Estos resultados indicaron que la cepa recombinante expresaba la enzima glucoamilasa, la cual hidrolizaba el almidón presente en el medio de cultivo, por consiguiente disminuía la concentración de este sustrato en el sobrenadante del cultivo, y finalmente se liberaba la glucosa para su crecimiento.

Figura 8-A

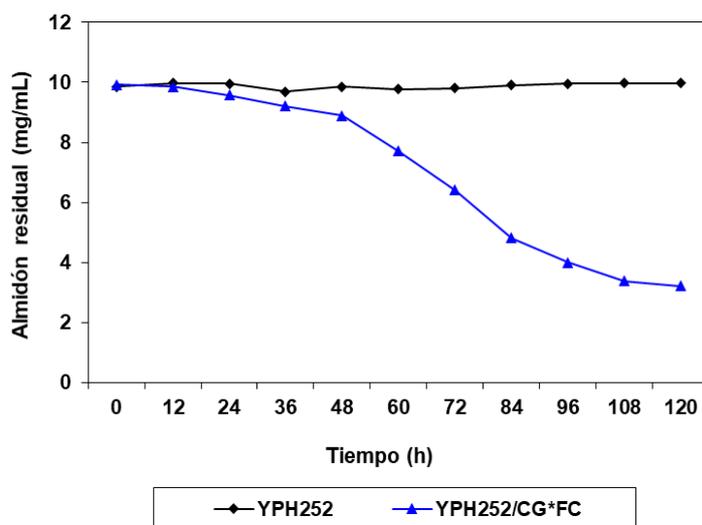
*Curva de crecimiento de las cepa recombinante YPH252/CG*FC y control negativo YPH252*



Nota. Las células de levadura fueron cultivadas en medio de cultivo YPA (conteniendo 1% de almidón, sin glucosa) e incubadas a 28 °C y con una agitación de 150 rpm. Tomada de Fuentes Rivera, 2008.

Figura 8-B

*Detección de almidón residual presente en el sobrenadante de los cultivos de las cepa recombinante YPH252/CG*FC y control negativo YPH252*

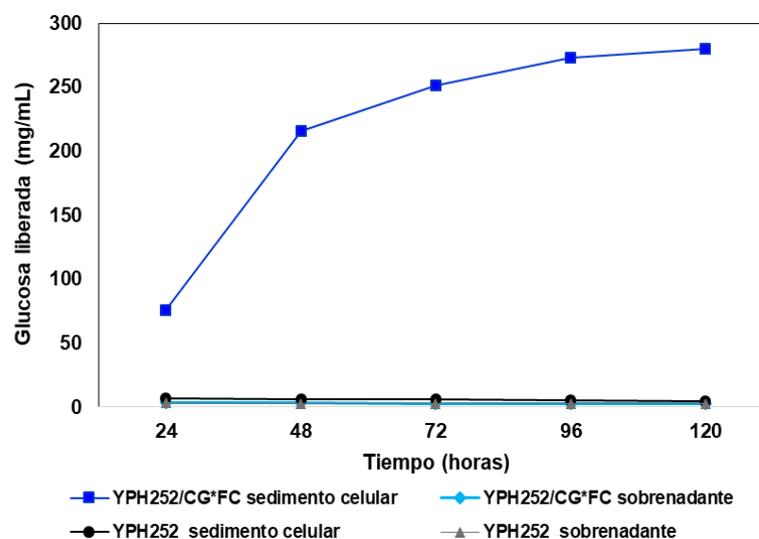


Nota. Las células de levadura fueron cultivadas en medio de cultivo YPA (conteniendo 1% almidón) e incubadas a 28 °C y con una agitación de 150 rpm. Tomada de Fuentes Rivera, 2008.

La actividad enzimática de la glucoamilasa fue detectada en la fracción celular de la cepa recombinante YPH252/CG*FC pero no fue detectada en el medio de cultivo, indicando que la enzima glucoamilasa estaba asociada a la superficie celular de la cepa recombinante y no estaba siendo excretada al medio de cultivo (sobrenadante). Durante el ensayo, el cultivo celular de la cepa recombinante fue centrifugada y separada en dos fracciones: sedimento celular y sobrenadante. Ambas fracciones fueron incubadas, separadamente, con solución de almidón (1%), para posteriormente dosar la glucosa liberada a partir del sustrato de almidón, el mismo procedimiento fue realizado en la cepa control negativo.

Figura 9

Detección de glucosa liberada a partir de la degradación de almidón en el sedimento y sobrenadante

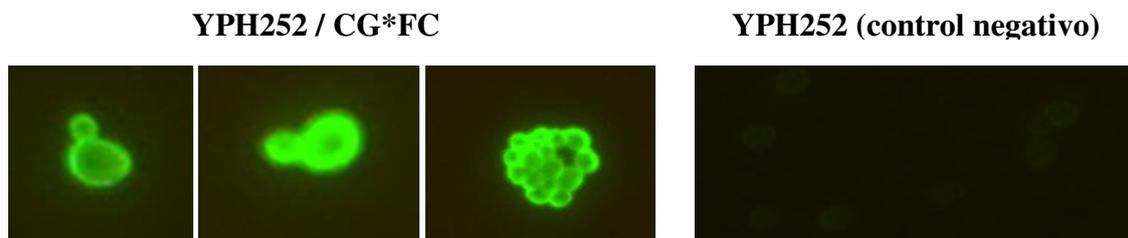


Nota. La cuantificación de la glucosa liberada, en los cultivos de la cepa recombinante YPH252/CG*FC y el control negativo YPH252, fue determinada en la fracción del sedimento celular y en su respectivo sobrenadante, previamente centrifugadas. Tomada de Fuentes Rivera, 2018.

La localización de glucoamilasa en la superficie celular de levadura fue confirmada por inmunofluorescencia. Esta técnica permitió observar fluorescencia en la superficie celular de la cepa recombinante, demostrando que glucoamilasa fue expresada y anclada en su superficie celular externa. En el caso del control negativo (cepa YPH252) no fue observado ningún tipo de fluorescencia (Figura 10).

Figura 10

Micrografía de Inmunofluorescencia de cepa recombinante YPH252/CG*FC y su respectivo control negativo



Nota. Micrografías de inmunofluorescencia de células de levadura utilizando anticuerpo primario anti-glucoamilasa y anticuerpo secundario marcado con FITC. Tomada de Fuentes Rivera, 2009.

Los resultados obtenidos demostraron la funcionalidad del sistema de anclaje construido que permite inmovilizar enzimas o proteínas de interés en la superficie celular de levadura, dotando a las células con nuevas propiedades benéficas y convirtiéndolas en un organismo atractivo capaz de actuar como biocatalizador celular.

2.3.2 Construcción de una cepa de levadura diseñada para la biorremediación de mercurio

El desarrollo de biosorbentes ha ido creciendo nos últimos años debido a su potencial en el tratamiento de aguas contaminadas con iones metálicos tóxicos.

El sistema de anclaje de péptidos o proteínas heterólogas que se unen a iones metálicos en la superficie celular externa de *S. cerevisiae* posibilitó la construcción de biosorbentes para la remoción de iones metálicos tóxicos (Kuroda y Ueda, 2011) (Tabla 3). La adsorción en la superficie celular, utilizando técnicas de ingeniería genética, tiene ventajas en comparación a la acumulación intracelular convencional (bioacumulación), por ejemplo los iones adsorbidos en la superficie celular pueden ser fácilmente recuperados sin ruptura celular, siendo posible la reutilización de los biosorbentes celulares para la adsorción de iones metálicos tóxicos.

Tabla 3

Sistema de anclaje de péptidos o proteínas que se unen a iones metálicos tóxico en la superficie celular de la levadura *S. cerevisiae*.

Péptido/Proteína que se une a metal	Proteína ancla	Eficiencia de remoción del metal	Referencia
Hexa histidina -Takamilasa	Cwp 1p	Cu ²⁺ , Ni ²⁺ e Zn ²⁺ = Aumento de 1,6-1,8 veces	Kambe-Honjoh et al., 2000
Hexa histidina	α-aglutinina	Cu ²⁺ = Aumento de 3 - 8 veces	Kuroda et al., 2001
Péptido rico en histidina (HP ₃)	α-aglutinina	Zn ²⁺ = Aumento de 20%	Vinopal et al., 2007
Péptido rico en cisteína (CP ₃)	α-aglutinina	Cd ²⁺ = Aumento de 30%	Vinopal et al., 2007
YTM - Hexa histidina YTM = Metalotioneína de levadura	α-aglutinina	Cd ²⁺ = Aumento considerable	Kuroda; Ueda, 2003
YTM ₄	α-aglutinina	Cd ²⁺ = Aumento de 5,9 veces	Kurod; Ueda, 2006
YTM ₈	α-aglutinina	Cd ²⁺ = Aumento de 8,7 veces	Kuroda; Ueda, 2006

Nota. Tomada de “Molecular design of the microbial cell surface toward the recovery of metal ions”, por Kuroda y Ueda, 2011, *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3).

Los tratamientos convencionales para retirar iones Hg^{2+} de aguas o efluentes contaminados, como precipitación, filtración y adsorción por membrana (Environmental Protection Agency [EPA], 2007), no son tan eficientes para reducir concentraciones Hg^{2+} a niveles aceptables. Para la remoción eficiente de iones Hg^{2+} , la tecnología se centra en el desarrollo de biosorbentes para la remoción eficaz de mercurio (Byrnes-Brower et al., 1997). En este sentido, tanto péptidos naturales, como metalotioneínas, y péptidos sintéticos, como fitoquelatinas sintéticas (por ejemplo, EC20), que se unen a metal fueron expresados en la superficie de las células bacterianas para mejorar la captación y biosorción de iones mercurio (Bae et al., 2000, 2001, 2002). Sin embargo, el problema principal asociado con estos péptidos ricos en cisteínas es su falta de especificidad, que puede causar dificultad en la recuperación específica y el reciclaje de iones Hg^{2+} .

Existen bacterias que desarrollan resistencia a metales pesados al expresar un conjunto de proteínas de resistencia. En el caso específico de las bacterias que presentan resistencia a iones Hg^{2+} , varios autores verificaron que estas bacterias contienen operón *mer* y que las proteínas codificadas por los genes del operón son responsables por la resistencia y desintoxicación de Hg^{2+} . Una proteína de particular interés es la proteína metalorreguladora MerR, la cual controla su propia expresión y la expresión de los productos génicos del operón *mer*.

La afinidad de unión de la proteína MerR a los iones Hg^{2+} es varias órdenes de magnitud mayor que para otros metales pesados tóxicos (Bontidean et al., 1998); esta proteína presenta un dominio de unión formado por un arreglo trigonal de tres cisteínas que forman un sitio de unión altamente específico para Hg^{2+} , promoviendo una fuerte interacción de los grupos sulfhidrilos de las cisteínas con el ion Hg^{2+} .

En base a lo que se conoce sobre la proteína MerR, proteína con mayor afinidad a iones Hg^{2+} ; y la utilización de Flo428 como ancla para inmovilización de proteínas heterólogas en la

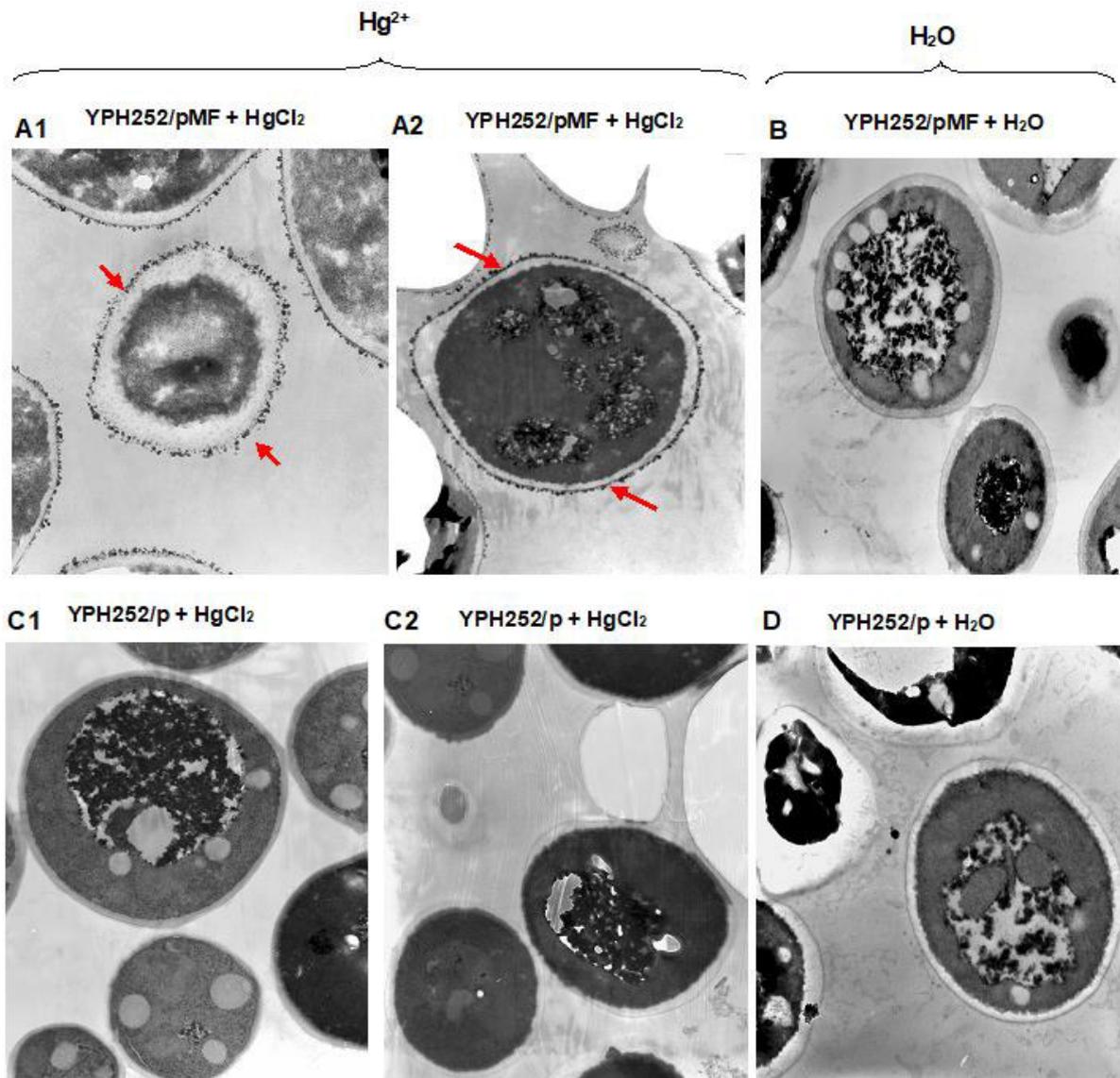
pared celular de levadura, fue realizada la construcción de una cepa recombinante de *S. cerevisiae*, que expresa la proteína MerR anclada en su superficie celular, diseñada para la biorremediación de mercurio (Fuentes Rivera, 2013).

Para ello fue realizado una fusión génica entre el gen codificador de la proteína MerR de *Cupriavidus metallidurans* y la secuencia codificadora de Flo428. Previamente fue retirado el codón de terminación de MerR, pero se conservó el codón de terminación de la secuencia codificadora de Flo428 con la finalidad de que la fusión génica “MerR-Flo428” fuese traducida como una única proteína. En esta construcción fue utilizada la secuencia señal del factor alfa (SS) de *S. cerevisiae* como péptido señal. La fusión génica (SS-MerR-Flo428) fue insertada en un vector de expresión, el cassette de anclaje de MerR fue expresado sobre la regulación del promotor y terminador del gen codificador de la fosfoglicerato quinasa (*PGK*). El vector obtenido conteniendo el cassette de expresión y anclaje de MerR fue utilizado en la transformación genética de la cepa de *S. cerevisiae* YPH252, obteniéndose colonias recombinantes de *S. cerevisiae*, denominadas YPH252/pMF (Fuentes Rivera, 2010, 2013). Por otro lado, se utilizó como control negativo, la cepa de *S. cerevisiae* YPH252 transformada con el vector sin el cassette de expresión y anclaje de MerR, denominado YPH252/p.

Las imágenes de la microscopia electrónica de transmisión (MET) demostraron que las células de la cepa recombinante YPH252/pMF, incubadas en solución de HgCl_2 (1,0 μM), presentaron nanoparticulas que recubrían su superficie celular externa, hecho que no fue observado en las células del control negativo (YPH252/p) incubadas en las mismas condiciones. Por lo tanto, los resultados indicaron, con claridad, la localización y unión de iones Hg^{2+} a la proteína MerR anclada en la pared celular externa de YPH252/pMF (Figura 11).

Figura 11

Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) de cortes histológicos de células de la cepa recombinante de S. cerevisiae YPH252/pMF y respectivo control negativo YPH252/p.



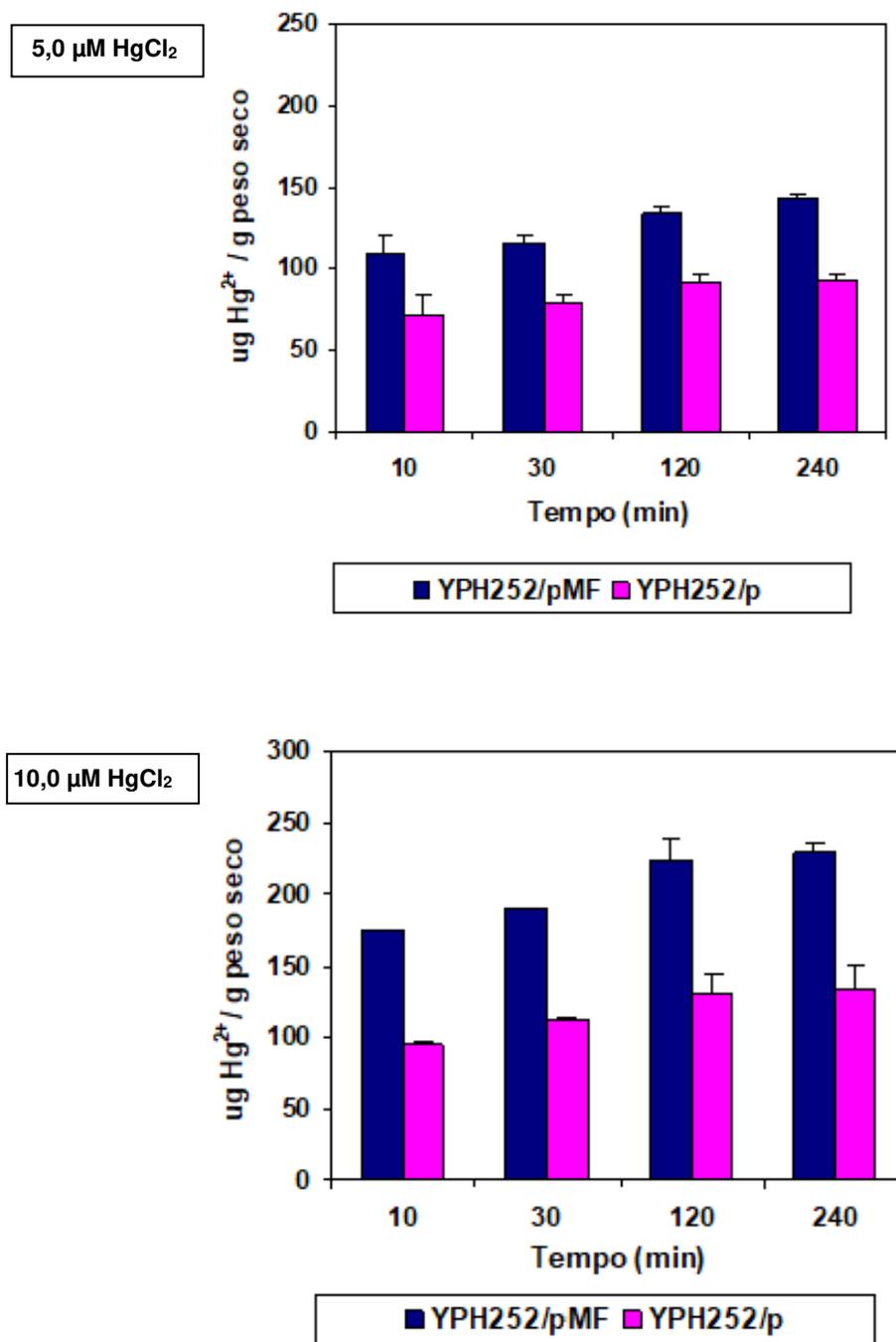
Nota. (A1) y (A2) - Células de *S. cerevisiae* YPH252/pMF incubadas en solución de HgCl_2 ($1,0 \mu\text{M}$); (B) - Células de *S. cerevisiae* YPH252/pMF incubadas con agua Milli-Q; (C1) y (C2) - Células de *S. cerevisiae* YPH252/p (control negativo) incubadas en solución de HgCl_2 ($1 \mu\text{M}$); (D) - Células *S. cerevisiae* YPH252/p incubadas con agua Milli-Q. Aumento de $15\ 000 \times$. Las flechas (→) indican la unión de iones Hg^{2+} a la proteína MerR anclada en la pared celular de la cepa recombinante. Tomada de Fuentes Rivera, 2013.

La cepa recombinante de *S. cerevisiae* YPH252/pMF y su respectivo control negativo YPH252/p fueron utilizados en ensayos de adsorción de iones Hg^{2+} . La cuantificación de la adsorción de iones Hg^{2+} en la biomasa celular de la cepa recombinante y en la biomasa celular del control negativo fue realizado por Espectrometría de Absorción Atómica en fase de vapor frío.

La figura 12 muestra que en ambas concentraciones de solución de HgCl_2 (5,0 μM y 10 μM), la velocidad de adsorción de iones mercurio de la biomasa celular de la cepa recombinante y del control negativo aumentó rápidamente en los primeros 10 minutos de incubación y luego disminuyó en los siguientes intervalos de tiempo. También se observó que en 5,0 μM de HgCl_2 , la cepa recombinante YPH252/pMF adsorbió 110 μg de Hg^{2+}/g de peso seco de células, después de 10 minutos de incubación, lo cual representó un aumento de 54% en la capacidad de adsorción de ión mercurio en relación al control negativo (YPH252/p), el cual adsorbió 70 μg de Hg^{2+}/g de peso seco de células. Mientras que en la concentración de 10 μM de HgCl_2 , la cepa recombinante YPH252/pMF adsorbió 174 μg de Hg^{2+}/g de peso seco de células, después de 10 minutos de incubación, representando un aumento de 84% en la capacidad de adsorción de ión mercurio en relación al control negativo, el cual adsorbió 94 μg de Hg^{2+}/g de peso seco de células (YPH252/p) (Fuentes Rivera 2013).

Figura 12

Adsorción de iones Hg^{2+} por la cepa recombinante de *S. cerevisiae* YPH252/pMF y su respectivo control negativo YPH252/p

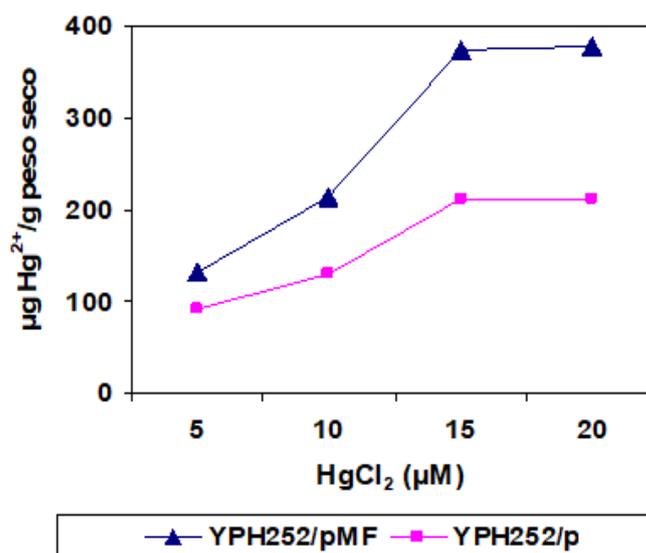


Nota. Las células de levadura fueron previamente cultivadas, luego lavadas con solución salina (0,9%) e incubadas en solución de $HgCl_2$ (5,0 μM y 10,0 μM), con una agitación de 150 rpm, a 28 °C, durante diferentes intervalos de tiempo. Tomada de Fuentes Rivera, 2013.

La capacidad de adsorción de iones Hg^{2+} de la cepa recombinante YPH252/pM aumentó con el incremento de la concentración de HgCl_2 hasta alcanzar la saturación en $15,0 \mu\text{M}$ de HgCl_2 , después de 120 minutos de incubación, siendo el valor máximo adsorbido de $374,86 \mu\text{g}$ de Hg^{2+}/g peso seco de célula (Figura 13). En estudios realizados por Madrid et al. (1995), referente a la utilización de *S. cerevisiae* para separar selectivamente metilmercurio y iones Hg^{2+} , fue observado que la adsorción de iones Hg^{2+} sigue una cinética de Michaelis-Menten basados en los sitios de uniones saturables localizados en la pared celular de levadura.

Figura 13

Capacidad de adsorción de iones Hg^{2+} de la cepa recombinante YPH252/pMF y su respectivo control negativo



Nota. Las células de levadura fueron incubadas en diferentes concentraciones de solución HgCl_2 durante 120 minutos, a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y con una agitación de 150 rpm. Tomada de Fuentes Rivera, 2013.

A partir de los resultados obtenidos inferimos que iones Hg^{2+} se unen al sitio activo de la proteína MerR anclada en la superficie celular externa de la levadura recombinante YPH252/pMF en tiempos cortos de incubación, seguidos de uniones no específicas del metal a otros componentes de la pared celular. Bae et al. (2003) sugirió una unión instantánea del ion Hg^{2+} al sitio activo de la proteína MerR anclada en la superficie celular de la cepa bacteriana *E. coli* JM109.

Es importante resaltar que hay pocos trabajos en la literatura relacionados a sistemas de biosorción de mercurio en *S. cerevisiae*. Los mecanismos de desintoxicación de Hg^{2+} en *S. cerevisiae* están menos claros que los mecanismos de resistencia a otros metales tóxicos como Cu^{2+} y Cd^{2+} (Gross et al. 2000; Lee et al., 1999; Vido et al., 2001). Zhu et al. (2004) verificó que *S. cerevisiae* fue utilizada como biosorbente de Hg^{2+} consiguiendo remover hasta el 96% de los iones, después de 15 min de incubación en 2,5 mM de Hg^{2+} , en pH 3,0 y empleando una biomasa celular de 40 g/L. Por otro lado, Mukherjee et al., (2009) aisló un mutante de *S. cerevisiae*, seleccionado en medio mínimo conteniendo mercurio, denominado *S. cerevisiae* A100, para aumentar la biosorción de mercurio. Se evaluó, también, el efecto de los elementos trazos del medio mínimo sobre la biosorción de Hg^{2+} por la cepa *S. cerevisiae* A100, la adición de algunos iones metálicos como Fe^{2+} , Mn^{2+} y Mo^{6+} en el medio mínimo conteniendo 1,5 mM de HgCl_2 aumentaron la eficiencia de adsorción de Hg^{2+} de 90 al 96,6%, por las células de levadura, después de 48 horas de incubación (Mukherjee y Banik, 2010).

Finalmente, los resultados obtenidos confirmaron la construcción de la cepa recombinante YPH252/pMF y la funcionalidad del sistema de anclaje de MerR en la superficie externa da levadura recombinante, aumentando su capacidad de biosorción de mercurio, con potencial para ser utilizada como herramienta biotecnológica para la biorremediación de aguas contaminadas con mercurio.

III. APORTES DESTACABLES A LA EMPRESA/INSTITUCIÓN

El laboratorio de Genética de Microorganismos y la compañía minera Vale firmaron un convenio referente a un proyecto que tenía como objetivo el desarrollo de microorganismos genéticamente modificados para la biorremediación de efluentes y aguas contaminadas por metales pesados tóxicos. En ese sentido, el equipo de investigadores del laboratorio desarrollamos proyectos de investigación para alcanzar el objetivo del proyecto principal.

Los aportes de este trabajo al laboratorio de Genética de Microorganismos son los siguientes:

- El desarrollo de un microorganismo genéticamente modificado con potencial para biorremediación de aguas o efluentes contaminados con mercurio, comprometiéndose en la búsqueda de procesos eficientes y amigables al medio ambiente para disminuir las concentraciones tóxicas de este metal pesado y colaborando de esta forma en la preservación del planeta.
- Fueron seleccionados algunos de los resultados para ser presentados en congresos internacionales, con previo aviso y permiso de la compañía VALE, financiadora del proyecto.
- Elaboración de una patente depositada y otorgada por el Instituto Nacional de Propiedad Industrial (INPI - Brasil), referente a la protección y derecho de uso de la cepa recombinante y de las secuencias génicas construidas para biorremediación (Fuentes Rivera, 2014).

IV. CONCLUSIONES

- ✓ Se comprobó la construcción del casete de expresión y anclaje de la proteína MerR en vector de transformación de *S. cerevisiae*. El nuevo vector fue empleado exitosamente en la transformación genética de la cepa de *S. cerevisiae* YPH252.

- ✓ Se construyó con éxito la cepa recombinante de levadura que presenta la proteína MerR anclada en su superficie celular externa.

- ✓ Se comprobó la ligación del ion Hg^{2+} a la proteína MerR y su localización en la superficie celular externa de la cepa recombinante a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

- ✓ La cepa recombinante construida mostró tener una capacidad aumentada de ligación de ion Hg^{2+} en relación a la cepa control negativo, con potencial para ser utilizada como herramienta biotecnológica para la biorremediación de mercurio.

V. RECOMENDACIONES

- A partir del presente trabajo se deberían realizar ensayos de biorremediación de mercurio en condiciones *ex situ*, en biorreactor, con el objetivo de:
1) establecer la cinética de ligación a iones Hg^{2+} ; 2) evidenciar la ligación específica del ion en cuestión (Hg^{2+}), a través de ensayos en conjunto con otros metales en solución; y, 3) establecer la biomasa necesaria de células de levadura recombinante en los procesos de biorremediación de ambientes contaminados con mercurio.

- A diferencia de los iones metálicos acumulados en el interior de la célula, los iones adsorbidos en la superficie celular pueden recuperarse fácilmente sin ruptura de las células. Por lo tanto, es necesario evaluar los principales métodos para la desorción de iones metálicos y de esta forma reutilizar la biomasa celular para próximos procesos de biorremediación.

VI. REFERENCIAS

- Alkorta I., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., A mezaga, I., Albizu, I. y Garbisu, C. (2004). Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3, 71-90.
- Babu, B.R., Parande, A.K. y Basha, C.A. (2007). Electrical and electronic waste: a global environmental problem. *Waste Management & Research*, 25(4), 307-318.
- Bae, W., Chen, W., Mulchandani, A. y Mehra R. (2000). Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatin. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(5), 518-523.
- Bae, W., Mehra, R. K., Mulchandani, A. y Chen, W. (2001). Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5335-5338.
- Bae, W., Mulchandani, A. y Chen, W. (2002). Cell surface display of synthetic phytochelatin using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 88(2), 223-227.
- Bae, W., Wu C., Kostal, J., Mulchandani, A. y Chen W. (2003). Enhanced mercury biosorption by bacterial cells with surface-displayed MerR. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3176-3180.
- Bontidean, B., Berggren, C., Johansson, G., Csöregi, E., Mattiasson, B., Lloyd, J., Jakeman, K. y Brown, N. (1998). Detection of heavy metal ions at femtomolar levels using protein-based biosensors. *Analytical Chemistry*, 70(19), 4162-4169.

- Boopathy R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Biosource Technology*, 74(1), 63-67.
- Byrnes-Brower, J., Ryan, R.L. y Pazirandeh, M. (1997). Comparison of ion-exchange resins and biosorbents for the removal of heavy metals from plating factory wastewater. *Environmental Science & Technology*, 31(10), 2910-2914.
- Castoldi, A., Coccini, T. y Manzo, L. (2003). Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. *Reviews Environmental Health*, 18(1), 19-31.
- Clarkson, T.W. (1997). The toxicology of mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 34(4), 369-403.
- Clarkson, T.W. (2002). The three modern faces of mercury. *Environmental Health Perspectives*, 110(1), 11-23.
- De Souza, J. y Barbosa, A. (2000). Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. *Química Nova*, 12, 3-7.
- Environmental Protection Agency [EPA]. 2007. *Treatment technologies for mercury in soil, waste and water*. <https://www.epa.gov/remedytech/treatment-technologies-mercury-soil-waste-and-water>
- Fuentes Rivera, J. (2008) *Construção de sistema que permite a ancoragem de proteína recombinante à superfície celular de Saccharomyces cerevisiae* [Tesis de maestría]. Universidade de São Paulo.
- Fuentes Rivera, J.P.N., Pereira, A., Schenberg, A.C. y Vicente, E.J. (2009). Construção de linhagem de Saccharomyces cerevisiae recombinante expressando glicoamilase ancorada à superfície celular [Resumen de presentación en congreso]. *Congreso Brasileiro de Microbiologia*, Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. <https://repositorio.usp.br/item/001787558>.

- Fuentes Rivera J., Schenberg A.C. y Vicente, E.J. (2010). Construction of a *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying MerR on the cell surface for enhanced mercury biosorption [Abstract of Poster sessions]. *Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting*, Vancouver, Canadá. <http://www.yeast-meet.org/2010/pdf/book.pdf#pagemode=bookmarks>.
- Fuentes Rivera, J. (2013). *Construção e caracterização de uma linhagem de levedura desenhada para a biorremediação de mercúrio* [Tesis de doctorado]. Universidade de São Paulo.
- Fuentes Rivera J., Schenberg A.C., Vicente, E.J., inventores. (2014). *Cassete de expressão- ancoragem para leveduras, plasmídeo recombinante, levedura recombinante e uso da referida levedura recombinante* (Patente Brasileira Nº BR1020140049495). Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
- Guoffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. y Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546-567.
- Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V.R., Brown, P.O. y Winge, D.R. (2000). Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 32310-32316.
- Harada, M. (1995). Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology*, 25(1), 1-24.
- Hitzeman, R.A., Hagie, F.E., Levine, H.L., Goedel, D.V., Ammerer, G. y Hall, B.D. (1981). Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature*, 293:717-722.

- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B. y Beeregowda, K.N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology*, 7(2), 60-72.
- Kiyono, M. y Pan-Hou, H. (2006). Genetic Engineering of Bacteria for Environmental Remediation of Mercury. *Journal of Health Science*, 52(3), 199-204.
- Kondo, A.E. y Ueda, M. (2004). Yeast cell surface display – Application of molecular display. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(1), 28-40.
- Kukuruzinska, M.A., Bergh, M.L.E. y Jackson, B.J. (1987). Protein glycosylation in yeast. *Annual Review of Biochemistry*, 56, 915-944.
- Kuroda, K. y Ueda, M. (2010). Engineering of microorganisms towards recovery of rare metal ions *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 53-60.
- Kuroda, K. y Ueda, M. (2011). Molecular design of the microbial cell surface toward the recovery of metal ions. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 427-433.
- Lambert, M., Leven, B.A. y Green, R.M. (2000). *New methods of cleaning up heavy metal in soils and water*.
https://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.files/fileID/14295
- Ledin, M. (2000). Accumulation of metals by microorganisms - processes and importance for soil systems. *Earth Science Review*, 51:1-31.
- Lee, J., Godon, C. y Lagniel, G. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 274(23), 16040-16046.
- Lee, S.Y., Choi, J.H. y Xu, Z. (2003). Microbial cell-surface display. *Trends in Biotechnology*, 21(1), 45-51.
- Li, P.S y Tao, H.C. (2015). Cell surface engineering of microorganisms towards adsorption of heavy metals. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(2), 141-149.

- Lipke, P.N y Ovalle, R. (1998). Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *Journal of Bacteriology*, 180(15), 3735-3740.
- Liu, R.X., Tang, H.X. y Lao, W.X. (2002). Advances in biosorption mechanism and equilibrium modeling for heavy metals on biomaterials. *Progress in Chemistry*, 14(2), 87-92.
- Madrid, Y., Cabrera, C., Perez-Corona, T. y Cámara, C. (1995). Speciation of methylmercury and Hg (II) using baker's yeast biomass (*Saccharomyces cerevisiae*). Determination by continuous flow mercury cold vapor generation atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry*, 67, 750-754.
- Marrero, J., Díaz, A. y Coto, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la Biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41 (1), 67-78.
- Micaroni, R.C., Bueno, M.M. y Jardim, W. (2000). Compostos de mercúrio. Revisão, métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova*, 23(4), 487-495.
- Miyamoto, C., et al. (1985). Molecular cloning and regulated expression of the human c-myc gene in *Escherichia* and *Saccharomyces*: comparison of the products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(21), 7732-7736.
- Mrsa, V. y Tanner, W. (1999). Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast*, 15(10A), 813-820.
- Mukherjee, K., Banik, A.K. y Das, M. (2009). Studies on biosorption of Hg²⁺ by Hg²⁺ resistant living and non-living *Saccharomyces cerevisiae* 100: characterization of some physical parameters and spectroscopic studies. *Journal of the Indian Chemical Society*, 86(8), 849-856.

- Mukherjee, K. y Banik, A.K. (2010). Effect of trace elements on biosorption of Hg^{2+} by Hg^{2+} tolerant *Saccharomyces cerevisiae* A100. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 192, 1-10.
- Murai, T., Ueda, M., Yamamura, M., Atomi, H., Shibasaki, Y., Kamasawa, N., Osumi, M., Amachi, T., y Tanaka, A. (1997). Construction of a starch-utilizing yeast by cell surface engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4), 1362-1366.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D. y Sreekanth, T.V.M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199-216.
- Nakamura, Y. Shibasaki, S., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H. y Kondo, A. (2001). Development of novel whole-cell immunoadsorbents by yeast surface display of the IgG-binding domain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 500-505.
- Pavezzi, F.C., Gomes, E. y Silva, R. (2008). Produção e caracterização da glicoamilase do fungo *Aspergillus awamori* expressa em levedura *Saccharomyces cerevisiae* usando diferentes fontes de carbono. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 108-114.
- Perego, P. y Howell, S.B. Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. (1997). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 147(2), 312-318.
- Porcella, D.B. (1994). Mercury in the Environment: Biogeochemistry. En C.J. Watras y E.J.W. Huckabe. (Ed.), *Mercury pollution integration and synthesis* (p. 2-7). CRC Press.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. y Clare, J.J. (1992). Foreign gene expression in yeast: A Review. *Yeast*, 8(6), 423-488.
- Sato, N., Matsumoto, T., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H. y Kondo, A. (2002). Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(4), 469-474.

- Schreuder, M.P., Mooren, A.T., Toschka, H.Y., Verrips, C.T. y Klis, F.M. (1996). Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends in Biotechnology*, 14(4), 115-120.
- Soares, E.V., Soares, H.MV.M. (2012). Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 1066-1083.
- Tabak, H.H., Lens, P., Van Hullebusch, E.D. y Dejonghe, W. (2005). Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides – 1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 4(3), 115-156.
- Teunissen, A.W., Holub, E., Van Der Hucht, J., Van Den Berg, J.Á. y Steensma, H.Y. (1993). Sequence of the open reading frame of the *FLO1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9(4), 423-427.
- Towler, D.A., Gordon, J.I., Adams, S.P. y Glaser L. (1988). The biology and enzymology of eukaryotic acylation. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 69-99.
- Ueda, M. y Tanaka A. (2000a). Genetic immobilization of protein on the yeast cell surface. *Biotechnology Advances*, 18(2), 121-140.
- Ueda, M. y Tanaka A. (2000b). Cell surface engineering of yeast- construction of arming yeast with biocatalyst. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(2), 125-136.
- United Nations Environment Program [UNEP]. (2002). *Global mercury assessment*. <https://wedocs.unep.org/handle/20.500.11822/12297>
- United Nations Environment Program [UNEP]. (2013). *Global mercury assessment 2013: Sources, emissions, releases, and environmental transport*. Geneva, 2013. <https://wedocs.unep.org/handle/20.500.11822/7984>

- Van der Vaart, J. M., Biesebeke, R., Chapman, J. W., Toschka, H. Y., Klis, F. M. y Verrips, C. T. (1997). Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 615-620.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure Applied Chemistry*, 73(7), 1163-1172.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B. y Labarre, J. (2001). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8469-8474.
- Volesky, B. (1990a). Biosorption and biosorbents. En B.Volesky (Ed.), *Biosorption of heavy metals* (p. 3-5). CRC Press.
- Volesky, B. (1990b). Biosorption by fungal biomass. En B.Volesky (Ed.), *Biosorption of heavy metals* (p. 140-171). CRC Press.
- Vullo, D.L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2(3), 93-104.
- Walker, G.M. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons.
- Wang, J. y Chen C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 427-451.
- Wang, J. y Chen C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27(2), 195-226.
- Watari, J., Takata, Y., Ogawa, M., Sahara, H., Koshino, S., Onnela, M.L., Airaksinen, U., Jaatinen, R., Penttilä, M. y Keränen, S. (1994). Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. *Yeast*, 10(2), 211-225.

Wernéus, H. y Ståhl, S. (2004). Biotechnological applications for surface-engineered bacteria.

Biotechnology Applied Biochemistry, 40(3), 209-228.

Zhu, Y.M., Zhou, D.Q. y Wei, D.Z. (2004). Biosorption of Hg^{2+} by *Saccharomyces cerevisiae*.

Journal of Northeastern University (Natural Science), 25, 89-91.