



Comisión Nacional de Investigación  
Científica y Tecnológica - CONICYT



COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACION CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

VERSION OFICIAL NÂ° 3

FECHA: 19/05/2017

**N° PROYECTO :** 1130822      **DURACIÓN :** 4 años      **AÑO ETAPA :** 2016  
**TÍTULO PROYECTO :** YEAST PLATFORMS FOR THE PRODUCTION OF NATURAL FLAVOR COMPOUNDS.

**DISCIPLINA PRINCIPAL :** INGENIERIA QUIMICA

**GRUPO DE ESTUDIO :** INGENIERIA 3

**INVESTIGADOR(A) RESPONSABLE :** EDUARDO ESTEBAN AGOSIN TRUMPER

**DIRECCIÓN :**

**COMUNA :**

**CIUDAD :** Santiago

**REGIÓN :** METROPOLITANA

**FONDO NACIONAL DE DESARROLLO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO (FONDECYT)**

Moneda 1375, Santiago de Chile - casilla 297-V, Santiago 21

Telefono: 2435 4350 FAX 2365 4435

Email: informes.fondecyt@conicyt.cl

**INFORME FINAL**  
**PROYECTO FONDECYT REGULAR**

MODIFICACIONES ACADÉMICAS

El informe no presenta modificaciones académicas.

## INFORME FINAL RESULTADOS FONDECYT

### 1. Implementación de las herramientas moleculares y analíticas para la síntesis de terpenos en levadura.

**1.1 Transformación de levaduras y construcción de plasmidios:** Durante el proyecto se utilizaron dos cepas de levadura *S. cerevisiae*: BY4741 y CENPK 113. Ambas levaduras en un comienzo fueron transformadas con un kit comercial (Zymo Research), pero luego se implementó el protocolo de transformación con Acetato de Litio (Gietz y Sciestl, 2007), ya que mostró una mayor eficiencia de transformación. Las cepas fueron sembradas en placas YPD con antibiótico adecuado o medio SC-ura o -leu según la auxotrofia de la cepa.

Para la construcción de los diversos plasmidios de expresión, se implementaron 3 técnicas de clonamiento: USER cloning, Gibson Assembly y Yeast recombinational cloning (YRC), siendo las 3 técnicas exitosas para la construcción de diversos vectores. USER Cloning permitió la construcción de diversos vectores de integración, mientras que Gibson Assembly y YRC permitieron principalmente la construcción de vectores de expresión episomal. Como método rutinario se decidió continuar con la técnica de Gibson Assembly, debido a su alta eficiencia y versatilidad, y a su bajo costo asociado.

Para las expresiones de genes se utilizaron plasmidios pRS246 (episomal alto número de copias), y plasmidios de la librería EasyClone (integrativos). En cuanto a promotores en una primera instancia se trabajó con promotores inducibles a galactosa (pYES2.1) pero finalmente se decidió construir las factorías celulares con los promotores fuertes constitutivos TEF1, PGK1 y GPD1, debido a su alta eficiencia en la expresión y menor tiempo de evaluación.

### 1.2 Construcción de cepas de levadura:

**1.2.1 Implementación del sistema de expresión de luz en levadura:** Se implementó en la cepa BY4741 un sistema de expresión por luz, basado en los fotoreceptores de luz azul WC1 y VVD de *Neurospora crassa*. Este sistema de expresión por luz utiliza los dominios de unión a DNA (BD) y el dominio de transactivación (AD) de *GAL4*, permitiendo controlar la expresión de cualquier gen bajo el control del promotor de *GAL1*. El sistema inicialmente se utilizó para controlar el gen reportero de la luciferasa de forma episomal, bajo el control del promotor de *GAL1* y el promotor 5XpGAL1; este último presenta 5 repeticiones de la secuencia de unión para el factor de transcripción *GAL4*. Los resultados mostraron altos niveles de inducción del gen reportero en presencia de luz constante (LL) y bajos niveles de inducción en oscuridad constante (DD), para ambos promotores, tanto en la cepa BY4741 wt (wild type o silvestre) como en la cepa BY4741 *gal4Δ-gal80Δ*. Adicionalmente, el gen reportero de la luciferasa bajo el control de los promotores *GAL1* y 5XpGAL1 fueron integrados en el locus de *GAL3*. Se obtuvo altos niveles de expresión del gen reportero en LL y bajos niveles en DD, demostrando que la integración en el genoma del gen reportero reduce cerca de 20 veces los niveles de inducción del sistema.

Utilizando los datos de expresión del gen reportero en condiciones de LL y DD, calculamos los niveles de inducción del sistema en LL con respecto a DD para los dos promotores utilizados. Los resultados mostraron niveles máximos de inducción de 623 veces para el promotor de *GAL1* controlando el reportero episomal en la cepa wt. En cambio, en la cepa *gal4Δ-gal80Δ* el máximo de expresión fue de 2137 veces con el promotor 5XpGAL1. La integración del gen reportero en el locus de *GAL3* disminuyó los niveles de expresión, con un máximo de 45 veces para el promotor de *GAL1* en la cepa wt y 96 veces para el promotor 5XpGAL1 en la cepa *gal4Δ-gal80Δ*. En general, nuestros resultados demuestran mayores niveles de inducción del reportero controlado por el promotor de *GAL1* en la cepa wt y el promotor 5XpGAL1 en la cepa *gal4Δ-gal80Δ*.

A fin de validar el empleo del sistema de expresión por luz para controlar genes que participan en fenotipos de interés biotecnológico en levaduras, se utilizó el sistema de expresión por luz para controlar genes relacionados al proceso de floculación (genes *FLO1*, *FLO11*, *TUP1*). La cepa con este gen controlado por luz mostró altos niveles de floculación en LL, observándose agregación celular solo en presencia de luz con un bajo índice de sedimentación, es decir, una alta precipitación de las células en el tiempo en LL. Resultados similares a los obtenidos con *FLO1* fueron obtenidos utilizando el sistema de expresión por luz para controlar los genes *FLO11* y *TUP1*, demostrando la factibilidad de este sistema sintético para controlar floculación en levaduras, fenotipo de alto potencial industrial. Estos resultados demuestran que el sistema de expresión por luz basado en los fotoreceptores de *N. crassa* WC1 y VVD permite controlar la expresión de genes en levadura y permitirá desarrollar nuevas cepas con potencial biotecnológico, que además pueden ser utilizadas como chasis para la producción de compuestos de alto valor industrial (**Salinas et al., 2017; patente sistema optogenético, 2016**).

#### 1.2.2 Construcción de una plataforma para la síntesis de monoterpenos en levadura:

Se construyeron varias cepas de levaduras para aumentar la síntesis de precursores de terpenos, modificando solo genes propios de levadura. En primer lugar, se sobreexpresó el gen *tHMG1* en su versión truncada en la cepa BY4741. El incremento en la expresión permite aumentar el flujo de carbono por la vía del mevalonato en *S. cerevisiae*. Siguiendo esta idea se construyeron 3 cepas estables con 1, 3 o 5 copias extras de este gen. La cuantificación de escualeno demostró efectivamente un aumento de 2, 3 y 5 veces comparado con cepas parental. Sobre la cepa que expresa 3 copias extras, se integró además una copia del gen de la enzima limoneno sintasa (LS) de *Cannabis sativa*, pero no se logró producir limoneno en cultivos de esta cepa.

Usando el sistema de luz implementado anteriormente, se diseñó una estrategia para controlar la expresión del gen LS en una cepa de levadura BY4741, sin la sobreexpresión de otros genes. Usando luz como inductor, se alcanzó un aumento de 3 veces en la expresión del gen, comparado con la inducción por galactosa. Sin embargo, esto tampoco se tradujo en un aumento en la concentración de limoneno.

En paralelo, se construyó otra cepa de levadura (derivada de la cepa CENPK-113) con la vía completa de síntesis del monoterpeno carvona. Esta cepa, cedida por el Dr. Jens Nielsen, tiene varias modificaciones genéticas para la acumulación del metabolito FPP, precursor de sesquiterpenos, tales como una copia extra de los genes *tHMG1* y *ERG20*, delección de los genes *LPP1* y *DPP1* y modificación del promotor del gen *ERG9* para disminuir su expresión. Sobre esta cepa se eliminó la copia extra del gen *ERG20* para favorecer la síntesis de GPP, precursor de monoterpenos y disminuir así, la producción de FPP. Luego, se integró una copia del gen geranilpirofosfato sintasa (GPPS) de *Abies grandis*, y otra de los genes limoneno sintasa (LS), limoneno hidroxilasa (LH), y carveol deshidrogenasa (CD) de *Mentha spicata*. Debido a que la enzima LH pertenece a la familia de las P450, se decidió, además, integrar el partner redox ATR1 de *Arabidopsis thaliana* completando así la vía. Sin embargo, no se logró cuantificar ni el precursor limoneno ni el producto final carvona. Finalmente, para evitar que el GPP producido sea consumido por la FPPS nativa, se fusionó el gen de la GPPS con el gen de la enzima LS (GPPS-LS), pero la expresión de este nuevo gen tampoco se tradujo en la aparición de limoneno.

Considerando las dificultades de expresión, y probablemente de inhibición del crecimiento por producto, decidimos no continuar esta línea de investigación.

#### 1.2.3 Construcción de una plataforma para la síntesis de C13-norisoprenoides en levadura:

Se construyeron siete cepas de levadura (CENPK-113 modificada) a partir de la integración de una copia adicional del gen geranilgeranil difosfato de levadura (*Bts1*), junto con los genes carotenogénicos *crtYB* y *crtI* de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, resultando en células productoras de  $\beta$ -caroteno. La integración adicional del gene *CCD1*

de *Petunia hybrida*, capaz de cortar enzimáticamente el  $\beta$ -caroteno, permitió producir bajas concentraciones de  $\beta$ -ionona ( $0.073 \pm 0.01$  mg/g DCW); y un cambio de color de la cepa, de anaranjado a amarillo. La adición en esta última cepa de un vector de alto número de copias del gen crtYB, incrementó la concentración de  $\beta$ -ionona 5 veces ( $0.34 \pm 0.06$  mg/g DCW). Adicionalmente, la expresión episomal del gen crtYB en conjunto con el gen CCD1 (en un mismo vector), resultó en un incremento de más de 8 veces en la concentración de  $\beta$ -ionona ( $0.63 \pm 0.02$  mg/g DCW). Fermentaciones batch en bioreactor de esta cepa permitió alcanzar una concentración específica de 2.4 mg/g a las 42 horas, i.e. un incremento de 34 veces comparado con la cepa inicial. Esta cepa representa el comienzo de la producción de aromas a través de un proceso sustentable y económico, y que permitirá el reemplazo de los actuales métodos químicos (**López et al, 2015; Cataldo et al, 2016; Tesis Master of Science Jan Herzog, 2015**).

1.2.4 Implementación de un sistema de co-localización de enzimas en membranas de levadura: Debido a que en la naturaleza las enzimas de una vía se encuentran altamente reguladas para su expresión coordinada, se evaluó la posibilidad de modificar las enzimas responsables de la vía de monoterpenos para su redirección a membranas lipídicas. Para esto, se evaluaron diversas modificaciones post-traduccionales con moléculas hidrofóbicas, como el ácido palmítico, el ácido mirístico, y preniles como FPP o GGPP, en una proteína control (EGFP). Se escogieron tres tipos de modificaciones del tipo C-terminal y se incluyó, además, la secuencia NH<sub>2</sub>-terminal de Gpa1p, la cual fue usada como control de localización en membrana celular. Las tres secuencias cubren las modificaciones post-traduccionales mediante palmitoilación y/o prenilación. La localización en la membrana de EGFP con el péptido de control fue corroborada mediante microscopía confocal. Los resultados preliminares muestran que la localización de la proteína EGFP modificada con los péptidos en estudio se asemeja a la localización en membrana, pero no fue posible corroborarla por deficiencias metodológicas, tales como el uso de fijación en formaldehído, fluorescencia deficiente y resolución espacial limitada de la microscopía confocal. Sin embargo, se debe continuar investigando el potencial de esta estrategia para optimizar la producción heteróloga de isoprenoides en levadura (**Memoria Rodrigo Santibañez, en revisión**).

1.2.5 Síntesis de sesquiterpenos nerolidol y patchoulol/Síntesis del diterpeno miltiradieno: Estos dos objetivos no fueron alcanzados debido a la publicación de trabajos similares y patentes, por otros grupos de investigación (Albertsen et al., 2011; Gruchattka y Kayser, 2015; Dai et al., 2012; US8173405 B2)

### **1.3 Cuantificación de metabolitos de las vías y productos finales:**

1.3.1 Cuantificación de IPP, DMAPP, GPP y FPP: La separación, identificación y cuantificación de los isoprenoides fue realizada en un sistema UHPLC Dionex modelo Ultimate-3000 que consiste en una bomba cuaternaria, un inyector automático con control de temperatura y un compartimiento termorregulado para columna acoplado a un espectrómetro de masas Exactive plus. El método utilizado es una modificación de Lu et al., 2010. La optimización del detector (*tuning*) fue realizada por la infusión directa de estándares de DMAPP, GPP, FPP, acetil-CoA, MVA (m/z 147,07; Sigma-Aldrich), GGPP, y timolftaleína fosfato, cada uno a 0,5 [ $\mu$ g/mL].

1.3.2 Cuantificación de esteroides: La extracción de esteroides intracelulares se realizó a partir de pellet celular, siguiendo los protocolos de Shang et al., 2006, y Cheng et al., 2010. Para el análisis por HPLC se realizaron curvas de calibración con concentraciones conocidas de escualeno, epoxy-escualeno y ergosterol. Los compuestos de interés se separaron en una columna Lichrospher eluida con una solución de metanol: agua (97:3, vol/vol), en condiciones isocráticas. Un detector con arreglo de diodos UV/VIS fue

empleado para detectar los esteroides. Finalmente, cada metabolito fue cuantificado, normalizando por estándar interno y usando una curva de calibración con los estándares de HPLC en un rango de 0,2 - 100 [mg /L].

1.3.3. Cuantificación de limoneno/carvona: Se montó una metodología general para análisis de terpenos, consistente en extracción de compuestos con dodecano y luego separación y cuantificación por cromatografía gaseosa acoplada a detector de ionización en llama, usando una columna capilar HP-5 (60 m x 0,25 mm id). Las inyecciones se realizaron en modo splitless a 250°C. Las concentraciones de terpenos (limoneno y carvona) fueron calculadas por curva de calibrado en un rango de concentración entre 0,1-50 mg/L, usando 4IP3MP como estándar interno.

1.3.4 Cuantificación de  $\beta$ -ionona: El análisis de  $\beta$ -ionona también fue efectuado por cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de llama, pero se empleó una columna capilar DB-FFAP (60 m x 0,25 mm de diámetro interno; 0,25  $\mu$ m de espesor de película; Agilent Technologies), bajo un flujo constante de 1,2 [ml/min] y 45 psi de He como gas portador. Además, se obtuvieron los espectros de masas utilizando un cromatógrafo de gases HP6890A, conectado a un espectrómetro de masas HP 5975 C en el modo de impacto electrónico 50 (EI) en 70 eV. Las concentraciones de  $\beta$ -ionona fueron calculadas por curva de calibrado en un rango de concentración entre 0,1-50 mg/L, usando 4IP3MP como estándar interno.

1.3.5 Cuantificación de carotenos: Para cuantificar carotenoides éstos se extrajeron desde el pellet celular, previamente lavado con agua destilada y lisado con microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro en molidor de células (mini bead beater-16, Bio Spec Products, Bartlesville, OK, USA). Para extraer los pigmentos, se agregó una mezcla de acetona y apo- $\beta$ -carotenal empleado como estándar interno. Una vez que los restos celulares quedan de color blanco, se agregó éter de petróleo. Luego de varias extracciones, la solución recuperada se evapora y el extracto se utiliza para la medición del contenido de carotenoides por HPLC, en duplicado. Los compuestos fueron analizados en un HPLC Merck Hitachi (LaChrom®), compuesto por una bomba cuaternaria modelo L-7100, un desgasificador modelo L7612, un auto-muestreador modelo L-7250 y un horno modelo L-7350 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Previo al análisis, las muestras fueron suspendidas en acetona y se preparó una curva de calibración estándar con concentraciones conocidas de  $\beta$ - caroteno (0,2 - 15 mg /L). A la salida de la columna, los carotenoides fueron detectados con un detector de arreglo de diodos UV/VIS (Merck-Hitachi LaChrom L-7450A). Finalmente, cada metabolito fue cuantificado normalizando cada área en el cromatograma por el área correspondiente del estándar interno y usando una curva de calibración con los estándares de HPLC.

## **2. Desarrollo de un marco general para la modelación dinámica metabólica de la expresión de metabolitos secundarios.**

2.1 Desarrollo de un modelo cinético para la optimización de la producción de  $\beta$ -ionona. Se desarrolló un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias para la vía heteróloga de biosíntesis de  $\beta$ -ionona en *S. cerevisiae*, usando parámetros cinéticos y concentraciones enzimáticas obtenidas de literatura. La calibración del modelo fue realizada para estimar los parámetros cinéticos más relevantes del sistema biológico. Se obtuvo un buen ajuste entre los módulos diseñados y la dinámica biológica registrada mediante análisis experimental. Además, se hizo un diagnóstico de post-regresión para detectar posibles inconsistencias paramétricas del modelo. Finalmente, realizamos un análisis para identificar las etapas limitantes de la vía de biosíntesis de  $\beta$ -ionona en esta factoría celular. Las modificaciones genéticas propuestas mediante este trabajo proveen una

alternativa para el diseño de una nueva plataforma para la síntesis *de novo* de  $\beta$ -ionona, que podría alcanzar mejores rendimientos que las estrategias biotecnológicas actuales (**Tesis Magister Kritsye Leiva, paper en preparación**).

2.2. Desarrollo, calibración y validación de un modelo metabólico dinámico a escala genómica de *S. cerevisiae*: Se desarrolló un modelo dFBA a escala genómica de *S. cerevisiae* calibrado por primera vez con datos tanto de cultivos fed-batches aeróbicos como batches anaeróbicos, junto con un nuevo procedimiento para determinar cuáles parámetros del modelo son relevantes para calibración (en términos de sensibilidad, identificabilidad y significancia). El modelo dFBA contiene varias cinéticas, incluyendo crecimiento sub-óptimo, consumo de glucosa, ATP de mantenimiento, requerimiento de biomasa y producción de metabolitos secundarios. También integra datos de expresión génica. Por otro lado, el procedimiento de calibración usa optimización metaheurística y análisis de pre/post regresión, y fija iterativamente los parámetros que no tienen un rol significativo en el modelo, de manera de obtener modelos con un número razonable de parámetros. Finalmente, a los modelos obtenidos se les realiza una calibración cruzada para asegurar que sean predictivos. Usando este enfoque, se demostró que el consumo de glucosa, el crecimiento sub-óptimo, y las tasas de producción son mucho más útiles para calibrar los modelos que la expresión génica, los requerimientos de biomasa o el ATP de mantenimiento. Más aún, se obtuvieron modelos dFBA confiables con parámetros sensibles, significativos y sin correlaciones, que a la vez son capaces de calibrar varias condiciones experimentales. Estos modelos dFBA de levadura robustos y predictivos, permiten diseñar cepas optimizadas para diversas aplicaciones en ingeniería metabólica (**Sanchez et al., 2014**).

**3. Ingeniería de proteínas: Modelamiento de la enzima ERG20 de levadura y evaluación de mutaciones puntuales para mejorar su actividad catalítica:** Debido a que *S. cerevisiae* posee una farnesil difosfato sintasa (FPPS) cuya actividad solo genera FPP como producto final (produciendo GPP solo como un intermediario), se realizó un modelo *in silico* de la enzima con el fin de identificar aquellos residuos específicos que permitan convertirla en una GPPS. Un modelo por homología de GPPS de *A. grandis* (GPPS2) y las estructuras cristalinas de GPPS de *M. piperita* (3KRF) Y dos FPPS (1UBW y 4H5C), fueron usadas para estimar la energía de unión ( $\Delta G$ ) de DMAPP y GPP como posibles sustratos. Las estimaciones mostraron que ambas GPPS presentan una mayor afinidad por el sustrato DMAPP (C5) que por GPP (C10). En el caso de las FPPS se observó que, de acuerdo a las estimaciones, cada FPPS por separado presenta una mayor afinidad por GPP como sustrato en comparación con DMAPP. Basados en la secuencia y análisis estructural, los residuos K197, Q168, E165, A99 y F96 fueron candidatos para determinar el  $\Delta G$  de unión para ambos sustratos (DMAPP y GPP). Basado en los resultados obtenidos, el residuo A99 fue escogido para análisis *in vivo*. Cepas que expresaron las variantes de FPPS con mutaciones en el residuo 99 mostraron variaciones significativas en la concentración intracelular de isoprenos fosfato. Las mutaciones de FPPS afectaron tanto la concentración total, como la concentración individual de cada uno. En particular, la mutación A99W incrementó 3 veces la concentración de GPP y la mutación A99P, 1.6 veces. Para analizar un posible efecto sinérgico se construyeron cepas que expresaban la doble mutación A99X K197G de la proteína FPPS de *S. cerevisiae*. Anteriormente, la mutante A99T no modificó la acumulación de GPP, sin embargo, la cepa que expresó la doble mutante A99T K197G mostró una mayor acumulación de GPP que las cepas que expresaron cada una de esas mutaciones de forma individual, sugiriendo un efecto sinérgico de ambos residuos. De igual forma, las cepas que expresaron las mutantes de FPPS A99L K197G, A99M K197G, A99H K197G y A99E K197G mostraron un incremento en la concentración intracelular de GPP. (**Rubat et al., en 2da revisión**).

# PRODUCTOS

## ARTÍCULOS

Para trabajos en Prensa/ Aceptados/Enviados adjunte copia de carta de aceptación o de recepción.

**Nº :** 1  
**Autor (a)(es/as) :** López, J.; Essus, K.; Kim, I.; Pereira, R.; Herzog J.; Siewers V.; Nielsen J.; Agosin E.  
**Nombre Completo de la Revista :** Microbial cell factories  
**Título (Idioma original) :** Production of  $\gamma$ -ionone by combined expression of carotenogenic and plant CCD1 genes in *Saccharomyces cerevisiae*  
**Indexación :** ISI  
**ISSN :** 12934-015-0273-x  
**Año :** 2015  
**Vol. :** 14  
**Nº :** 84  
**Páginas :** 84-97  
**Estado de la publicación a la fecha :** Aceptada  
**Otras Fuentes de financiamiento, si las hay :**

**Envía documento en papel :** no  
**Archivo(s) Asociado(s) al artículo :**

---

**Nº :** 2  
**Autor (a)(es/as) :** Cataldo V.; López J.; Cárcamo M.; Agosin E.  
**Nombre Completo de la Revista :** Applied Microbiology and Biotechnology  
**Título (Idioma original) :** Chemical vs. biotechnological synthesis of C13-apocarotenoids: Current methods, applications and perspectives  
**Indexación :** ISI  
**ISSN :**  
**Año :** 2016  
**Vol. :** 13  
**Nº :** 100  
**Páginas :** 15  
**Estado de la publicación a la fecha :** Aceptada  
**Otras Fuentes de financiamiento, si las hay :**

**Envía documento en papel :** no  
**Archivo(s) Asociado(s) al artículo :**

---



**Nº :** 3  
**Autor (a)(es/as) :** Sánchez, B.J.; Pérez, J.R.; Agosin, E.  
**Nombre Completo de la Revista :** Metabolic Engineering  
**Título (Idioma original) :** Construction of robust dynamic genome--scale metabolic model structures of Saccharomyces cerevisiae through iterative re--parameterization  
**Indexación :** ISI  
**ISSN :** 1096-7176  
**Año :** 2014  
**Vol. :** 25  
**Nº :**  
**Páginas :** 159-173  
**Estado de la publicación a la fecha :** Publicada  
**Otras Fuentes de financiamiento, si las hay :**

**Envía documento en papel :** no  
**Archivo(s) Asociado(s) al artículo :**

---

**Nº :** 4  
**Autor (a)(es/as) :** Rubat, S.; Varas-Concha, I.; Sepulveda R.; Almonacid, D.; Gonzalez-Nilo, D.; Agosin, E.  
**Nombre Completo de la Revista :** FEMS Yeast Research  
**Título (Idioma original) :** Increasing the Intracellular Isoprenoid Pool in Saccharomyces cerevisiae by structural Fine-Tuning of a Bifunctional Farnesyl Diphosphate Synthase.  
**Indexación :** ISI  
**ISSN :**  
**Año :** 2017  
**Vol. :**  
**Nº :**  
**Páginas :**  
**Estado de la publicación a la fecha :** Aceptada  
**Otras Fuentes de financiamiento, si las hay :**

**Envía documento en papel :** no  
**Archivo(s) Asociado(s) al artículo :**

---

**Nº :** 5  
**Autor (a)(es/as) :** Salinas, F.; Rojas, V.; Delgado, V.; Agosin, E.; Larrondo, L.  
**Nombre Completo de la Revista :** Applied Microbiology and Biotechnology

**Título (Idioma original) :** Optogenetic switches for light-controlled gene expression in yeast  
**Indexación :** ISI  
**ISSN :** 1432-0614  
**Año :** 2017  
**Vol. :** 101  
**Nº :**  
**Páginas :** 2629-40  
**Estado de la publicación a la fecha :** Publicada  
**Otras Fuentes de financiamiento, si las hay :**

**Envía documento en papel :** no  
**Archivo(s) Asociado(s) al artículo :**

---

#### OTRAS PUBLICACIONES / PRODUCTOS

**Nº :** 1  
**Autor (a)(es/as) :** Larrondo, L.; Agosin, E.; Salinas, F.; Rojas, V.; Delgado, V.  
**Título (Idioma original) :** Sistema de expresión optogenético en levadura  
**Tipo de publicación o producto :** Patente  
**ISBN :**  
**Editor (es) (Libro o Capitulo de libros) :**  
**Nombre de la editorial /Organización :**  
**País :** CHILE  
**Ciudad :** Santiago  
**Fecha :** Noviembre - 2016  
**Año :**  
**Vol. :**  
**Nº :**  
**Páginas :**  
**Otras Fuentes de financiamiento, si las hay :**

**Envía documento en papel :** no  
**Archivo(s) Asociado(s) al artículo :**

---

## CONGRESOS

**Nº :** 1  
**Autor (a)(es/as) :** López, J.; Essus, K.; Kim, I.; Pereira, R.; Herzog J.; Siewers V.; Nielsen J.; Agosin E.  
**Título (Idioma original) :** Production of  $\gamma$ -ionone by combined expression of carotenogenic and plant CCD1 genes in *Saccharomyces cerevisiae*  
**Nombre del Congreso :** Bioflavours 2015: International Conference on Flavour and Fragrance Biotechnology  
**País :** ALEMANIA  
**Ciudad :** Frankfurt  
**Fecha Inicio :** 09/09/2015  
**Fecha Término :** 11/09/2015  
**Nombre Publicación :** Production of  $\gamma$ -ionone by combined expression of carotenogenic and plant CCD1 genes in *Saccharomyces cerevisiae*  
**Año :** 2015  
**Vol. :** 14  
**Nº :** 84  
**Páginas :** 84-97  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

**Nº :** 2  
**Autor (a)(es/as) :** Larrondo L.  
**Título (Idioma original) :** Enable technologies for Eukaryotic Synthetic Biology  
**Nombre del Congreso :** Enable technologies for Eukaryotic Synthetic Biology  
**País :** ALEMANIA  
**Ciudad :** Heidelberg  
**Fecha Inicio :** 21/06/2015  
**Fecha Término :** 23/06/2015  
**Nombre Publicación :**  
**Año :**  
**Vol. :**  
**Nº :**  
**Páginas :**  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

**Nº :** 3

**Autor (a)(es/as) :** López, J.; Kim IK.; Scalcinati G.; Khoomrung S.; Krivoruchko A.; Siewers V.; Agosin E.; Nielsen J.  
**Título (Idioma original) :** Yeast platform for the production of c13- norisoprenoids  
**Nombre del Congreso :** 5th Conference on Physiology of yeast and filamentous Fungi  
**País :** FRANCIA  
**Ciudad :** MONTPELLIER  
**Fecha Inicio :** 04/06/2013  
**Fecha Término :** 07/06/2013  
**Nombre Publicación :**  
**Año :**  
**Vol. :**  
**Nº :**  
**Páginas :**  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

**Nº :** 4  
**Autor (a)(es/as) :** Sánchez, B.J.; Pérez-Correa, J.R.; Agosin, E.  
**Título (Idioma original) :** Reparameterization analysis of a *S. cerevisiae* dynamic genome-scaled metabolic model.  
**Nombre del Congreso :** III Copenhagen Bioscience Conference: Cell Factories and Biosustainability.  
**País :** DINAMARCA  
**Ciudad :** Copenhagen  
**Fecha Inicio :** 05/05/2013  
**Fecha Término :** 08/05/2013  
**Nombre Publicación :**  
**Año :**  
**Vol. :**  
**Nº :**  
**Páginas :**  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

**Nº :** 5  
**Autor (a)(es/as) :** Sánchez, B.J.; Pérez-Correa, J.R.; Agosin, E.

**Título (Idioma original) :** Reparametrización de un modelo dinámico del metabolismo celular de *S. cerevisiae*.  
**Nombre del Congreso :** LXXXII Meeting of the Chilean Mathematical Society  
**País :** CHILE  
**Ciudad :** Olmué  
**Fecha Inicio :** 07/11/2013  
**Fecha Término :** 09/11/2013  
**Nombre Publicación :**  
**Año :**  
**Vol. :**  
**Nº :**  
**Páginas :**  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

**Nº :** 6  
**Autor (a)(es/as) :** López, J.; Essus, K.; Kim, IK.; Pereira, R.; Herzog, J.; Siewers, V.; Nielsen, J.; Agosin E.  
**Título (Idioma original) :** CONSTRUCTION OF A YEAST PLATFORM FOR THE PRODUCTION OF  $\beta$ -IONONE  
**Nombre del Congreso :** ICSB 2014 The International Systems Biology Conference  
**País :** AUSTRALIA  
**Ciudad :** MELBOURNE  
**Fecha Inicio :** 14/09/2013  
**Fecha Término :** 18/09/2013  
**Nombre Publicación :**  
**Año :**  
**Vol. :**  
**Nº :**  
**Páginas :**  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

## TESIS/MEMORIAS

**Nº :** 1  
**Título de Tesis :** Process Optimization for De Novo Aroma Synthesis of Beta- Ionone in Recombinant *S. cerevisiae*  
**Nombre y Apellidos del(de la) Alumno(a) :** Jan Herzog

**Nombre y Apellidos del(de la) Tutor(a) :** Eduardo Agosin  
**Título Grado :** Magister  
**Institución :** Pontificia Universidad Católica de Chile  
**País :** CHILE  
**Ciudad :** Santiago  
**Estado de Tesis :** Terminada  
**Fecha Inicio :** 03/11/2014  
**Fecha Término :** 29/05/2015  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

**Nº :** 2  
**Título de Tesis :** Construcción de una plataforma en levadura para la síntesis de aromas naturales a partir de biotecnología  
**Nombre y Apellidos del(de la) Alumno(a) :** Javiera López Salinas  
**Nombre y Apellidos del(de la) Tutor(a) :** Eduardo Agosin  
**Título Grado :** Doctorado  
**Institución :** Pontificia Universidad Católica de Chile  
**País :** CHILE  
**Ciudad :** Santiago  
**Estado de Tesis :** Terminada  
**Fecha Inicio :** 01/08/2009  
**Fecha Término :** 05/04/2016  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

**Nº :** 3  
**Título de Tesis :** Estrategias para la biosíntesis de ironas  
**Nombre y Apellidos del(de la) Alumno(a) :** Trinidad Pizarro Black  
**Nombre y Apellidos del(de la) Tutor(a) :** Eduardo Agosin  
**Título Grado :** Magister  
**Institución :** Pontificia Universidad Católica de Chile  
**País :** CHILE  
**Ciudad :** Santiago  
**Estado de Tesis :** En Ejecución  
**Fecha Inicio :** 02/03/2015  
**Fecha Término :** 31/12/2016  
**Envía documento en papel :** no

**Archivo Asociado :**

---

**N° :** 4  
**Título de Tesis :** Evaluación de la síntesis de damascenonas en *S. cerevisiae*  
**Nombre y Apellidos del(de la) Alumno(a) :** Maximiliano Ibaceta Acevedo  
**Nombre y Apellidos del(de la) Tutor(a) :** Eduardo Agosin  
**Título Grado :** Magister  
**Institución :** Pontificia Universidad Católica de Chile  
**País :** CHILE  
**Ciudad :** Santiago  
**Estado de Tesis :** En Ejecución  
**Fecha Inicio :** 01/08/2015  
**Fecha Término :** 31/07/2017  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

**N° :** 5  
**Título de Tesis :** Desarrollo de un modelo cinético para la optimización de la producción de  $\beta$ -ionona en *S. cerevisiae*  
**Nombre y Apellidos del(de la) Alumno(a) :** Kritsye Leiva Leiva  
**Nombre y Apellidos del(de la) Tutor(a) :** Eduardo Agosin  
**Título Grado :** Magister  
**Institución :** Pontificia Universidad Católica de Chile  
**País :** CHILE  
**Ciudad :** Santiago  
**Estado de Tesis :** En Ejecución  
**Fecha Inicio :** 01/03/2014  
**Fecha Término :** 28/04/2017  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

**N° :** 6  
**Título de Tesis :** Ingeniería de la enzima ERG20 de *S. cerevisiae* para la síntesis de monoterpenos

**Nombre y Apellidos del(de la) Alumno(a) :** Sebastian Rubat  
**Nombre y Apellidos del(de la) Tutor(a) :** Eduardo Agosin  
**Título Grado :** Doctorado  
**Institución :** Pontificia Universidad Católica de Chile  
**País :** CHILE  
**Ciudad :** Santiago  
**Estado de Tesis :** En Ejecución  
**Fecha Inicio :** 01/03/2009  
**Fecha Término :** 28/07/2017  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

**Nº :** 7  
**Título de Tesis :** Development, calibration and validation of a dynamic genome-scale metabolic model of *Saccharomyces cerevisiae*  
**Nombre y Apellidos del(de la) Alumno(a) :** Benjamín Sánchez Barja  
**Nombre y Apellidos del(de la) Tutor(a) :** Eduardo E. Agosin; J. R. Pérez-Correa  
**Título Grado :** Magister  
**Institución :** Pontificia Universidad Católica de Chile  
**País :** CHILE  
**Ciudad :** Santiago  
**Estado de Tesis :** Terminada  
**Fecha Inicio :** 01/03/2012  
**Fecha Término :** 10/01/2014  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

**Nº :** 8  
**Título de Tesis :** Implementación de la técnica de ensamblaje de ADN "Gibson Assembly" para el diseño y producción de una proteína de fusión  
**Nombre y Apellidos del(de la) Alumno(a) :** Stefani Leiva Navarro  
**Nombre y Apellidos del(de la) Tutor(a) :** Eduardo Agosin  
**Título Grado :** Pregrado  
**Institución :** Pontificia Universidad Católica de Chile  
**País :** CHILE  
**Ciudad :** Santiago  
**Estado de Tesis :** Terminada  
**Fecha Inicio :** 01/04/2013



**Fecha Término :** 16/01/2017  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

**Nº :** 9  
**Título de Tesis :** Aumento de la producción de beta caroteno mediante fermentaciones en bioreactores  
**Nombre y Apellidos del(de la) Alumno(a) :** Bastian Perez  
**Nombre y Apellidos del(de la) Tutor(a) :** Bastian Perez  
**Título Grado :** Pregrado  
**Institución :** Universidad Tecnológica de Chile Inacap  
**País :** CHILE  
**Ciudad :** Santiago  
**Estado de Tesis :** En Ejecución  
**Fecha Inicio :** 01/03/2016  
**Fecha Término :** 31/03/2017  
**Envía documento en papel :** no  
**Archivo Asociado :**

---

## ANEXOS

**Nº :** 1  
**Archivo Asociado :** CertificadoBioetica.pdf

---

**Nº :** 2  
**Archivo Asociado :** Informe\_difusion\_1130822.pdf

---

A continuación se detallan los anexos físicos/papel que no se incluyen en el informe en formato PDF.

--