



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Cuajimalpa

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería

Idónea comunicación de resultados

“Influencia de la temperatura de cultivo en la eficiencia de
transformación e integración de genes en cepas de
Kluyveromyces marxianus autóctonas”

Presenta: Ing. Biól. Sara Darinka Sánchez Robledo

Directora: Dra. Sylvie Le Borgne

Asesores: Dr. Juan Carlos Sigala Alanís

Dr. Luis Lozano Beltrán

Ciudad de México

2025



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Procesos y Tecnología (DPT) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa bajo la dirección de la Dra. Sylvie Le Borgne y la asesoría del Dr. Juan Carlos Sigala Alanís. Además, se contó con la asesoría bioinformática del Dr. Luis Lozano Beltrán del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en el ensamblado del genoma de las levaduras no convencionales *Kluyveromyces marxianus* autóctonas.

Esta ICR contó para su realización del patrocinio de la Dirección de Superación Académica (PRODEP-SEP) a través del proyecto 47410654 "Desarrollo de plataformas robustas para el análisis transcripcional en diversos modelos celulares" de la convocatoria 2019 de Fortalecimiento de Cuerpos Académicos en Formación) otorgado al cuerpo académico UAM-C-CA-42-Biotecnología Celular y Tisular y de la UAM-Unidad Cuajimalpa a través de los proyectos 87 S210-21 "Caracterización y potencial de aplicación de levaduras y bacterias autóctonas de México" de la DCNI y 47410613 "Fortalecimiento del laboratorio de biotecnología" de la Rectoría de Unidad.

Sara Darinka Sánchez Robledo contó con beca de posgrado Conahcyt (CVU 1147245) para realizar este trabajo.



Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental “Influencia de las condiciones de cultivo en la eficiencia de transformación e integración de genes en cepas de *Kluyveromyces marxianus* autóctonas” fue realizado de 08-2021 al 11-2023 en los laboratorios del Departamento de Procesos y Tecnología de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería.



DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, el día 16 del mes diciembre del año 2024, la que suscribe Sara Darinka Sánchez Robledo alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autora intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada; “Influencia de la temperatura de cultivo en la eficiencia de transformación e integración de genes en cepas de *Kluyveromyces marxianus* autóctonas” realizada bajo la dirección de la Dra. Sylvie Le Borgne y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso de la directora del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: sylvielb@cua.uam.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Sara Darinka Sánchez Robledo



DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La que suscribe, Sara Darinka Sánchez Robledo, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi directora y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

Sara Darinka Sánchez Robledo



DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

La que suscribe, Sara Darinka Sánchez Robledo alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Sara Darinka Sánchez Robledo.

Sara Darinka Sánchez Robledo

AGRADECIMIENTOS

Al mirar atrás y reflexionar sobre este camino, siento una profunda gratitud hacia todas las personas que, de una u otra forma, hicieron posible la realización de este sueño.

A mis padres, por enseñarme desde niña que los sueños se logran con esfuerzo, dedicación y constancia. Gracias por creer en mí, incluso en los momentos en los que dudé de mí misma. Su apoyo incondicional y amor son mi mayor fortaleza.

A mis abuelos, por su sabiduría y cariño inigualable. Su ejemplo y consejos me han inspirado a ser mejor cada día. Ustedes me enseñaron que con humildad y esfuerzo se pueden superar los retos más grandes.

A mis tíos, por sus palabras de ánimo, sus gestos de apoyo y por estar siempre presentes, aún en la distancia. Cada uno de ustedes ha sido una fuente de motivación y fortaleza para mí.

A mi hermano, mi compañero de vida. Gracias por ser mi apoyo incondicional, por nuestras conversaciones y por recordarme, en todo momento, que siempre tengo con quién contar.

A mi directora de tesis, la Dra. Sylvie Le Borgne, por su guía, paciencia y palabras de aliento. Más que una tutora, fue una fuente de inspiración, siempre recordándome que el conocimiento no solo se busca, sino que se comparte.

A mis asesores, el Dr. Juan Carlos Sigala Alanis y al Dr. Luis Lozano Aguirre Beltrán por su invaluable apoyo, guía y disposición a lo largo de este proyecto. Su experiencia, compromiso y acompañamiento fueron fundamentales para el desarrollo y culminación de esta tesis.

A la Dra. Patricia Ester Lappe Oliveras, por su atenta revisión y por haber proporcionado los aislados de *Kluyveromyces marxianus*. Su aportación fue clave para la realización de este proyecto y agradezco su disposición y apoyo en todo momento.

A mis compañeros del laboratorio de biotecnología, quienes se convirtieron en amigos y aliados en esta aventura. Juntos compartimos agradables momentos, risas, frustraciones y, sobre todo aprendizaje.

A mis amigos, que siempre supieron encontrar las palabras de aliento justas para levantar mi ánimo. Su fe en mí fue un motor que me impulsó en los momentos más difíciles.

Dedicatoria

A Leonorcita,

quien desde el cielo sigue iluminando mi camino.

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de la temperatura sobre la estructura de la pared celular y su relación con la eficiencia de transformación genética en cepas autóctonas de *Kluyveromyces marxianus*. En primer lugar, se determinó la ploidía de cinco cepas mediante PCR y análisis in silico de borradores genómicos, identificando que Kmx 14, Kmx 15, Kmx 22 y Kmx 24 son diploides, mientras que Kmx 16 es haploide de tipo a, lo que facilita su uso en estudios de transformación genética. Posteriormente, se evaluó la influencia de la temperatura sobre el crecimiento y la estructura de la pared celular. Todas las cepas crecieron en medio sólido hasta 45°C, excepto Kmx 11 y Kmx 15, solo lo hicieron hasta 42°C.

En cultivo líquido, la mayoría alcanzó su tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) a 42°C. Para caracterizar la pared celular, se realizaron ensayos de sensibilidad al blanco calcoflúor (CFW), los cuales sugirieron una mayor proporción de quitina en Kmx 11, Kmx 15 y Kmx 22, y una pared más resistente en que la exposición a 42°C promueve una mayor resistencia a la lisis celular, indicando un refuerzo estructural de la pared frente al estrés térmico.

Con base en estos hallazgos, se estableció un protocolo de transformación mediado por LiAc/PEG/ssDNA, optimizando su eficiencia mediante un choque térmico a 47 °C por 15 minutos. Esta condición incrementó la eficiencia de transformación, posiblemente debido a un aumento en la porosidad de la pared celular inducida por el calor. No obstante, se observaron limitaciones en la integración dirigida de ADN debido a la actividad predominante del mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ).

En conjunto, los resultados respaldan la hipótesis de que temperaturas elevadas inducen modificaciones estructurales en la pared celular que favorecen la transformación genética. Este estudio proporciona información valiosa para el diseño de estrategias de ingeniería genética en *K. marxianus*, una levadura con alto potencial para aplicaciones industriales en biotecnología, como la producción de bioetanol, proteínas recombinantes y compuestos de alto valor.

Contenido

Resumen	10
Contenido de figuras	16
Contenido de tablas.....	21
Capítulo I. Introducción	26
Capítulo II. Antecedentes	30
Ploidía	30
Pared celular de <i>K. marxianus</i>	43
Transformación en levaduras.....	44
Transformación de <i>K. marxianus</i>	45
Unión de extremos no homólogos (NHEJ)	48
Silenciamiento y aprovechamiento de la NHEJ en <i>K. marxianus</i>	51
Capítulo III. Objetivos e hipótesis	54
Objetivo general	54
Objetivos específicos	54
Hipótesis	54
Capítulo IV. Materiales y métodos	55
Mantenimiento de las cepas de estudio	55
Determinación de la ploidía.....	56
a) PCR del <i>locus</i> MAT.....	56
b) Análisis bioinformático del <i>locus</i> MAT	58
c) Construcción de árboles filogenéticos.....	59

Influencia de la temperatura de cultivo en el crecimiento y estructura de la pared celular	60
I. Termotolerancia en cultivo sólido.....	60
III. Cinéticas de crecimiento a diferentes temperaturas	61
IV. Ensayo de sensibilidad a la liticasa	62
Transformación de cepas de <i>K. marxianus</i>	63
I. Obtención de un cassette Lac4-KanMx-Lac4 a partir del plásmido pGEMT-lac4-kanMx-lac4.....	63
Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	63
Transformación del plásmido pGEMT-lac4-kanMx-lac4 en la cepa XL1-Blue de <i>E. coli</i> . 64	
Extracción de ADN plasmídico	65
Linealización del plásmido pGEMT-lac4-kanMx-lac4	65
Extracción, purificación y concentración del cassette <i>lac4-KanMx-lac4</i>	66
II. Obtención de cassette partiendo del plásmido pUC18LAC4-KanMX	67
a) PCR de fragmento <i>lac4-KanMx-lac4</i>	67
b) Extracción, purificación y concentración de <i>lac4-KanMx-lac4</i>	69
III. Preparación de células competentes y transformación de <i>K. marxianus</i>	70
IV. Comprobación de integración de los cassettes <i>Lac4-KanMx-Lac4</i>	72
a) Aislamiento de ADN genómico por el método de fenol cloroformo	72
b) Comprobación de la presencia de los cassettes <i>lac4-KanMx-lac4</i> en células transformantes.....	73

c) Comprobación de la identidad de las cepas por amplificación de la región ITS-5.8S	75
d) Análisis de microsatélites	77
e) Ubicación del gen LAC4 en genomas de las cepas autóctonas	78
Localización de genes involucrados en la remodelación de pared celular en cepas de <i>K. marxianus</i>	78
Capítulo V. Resultados y discusiones.....	79
I. Análisis de <i>locus</i> MAT en cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i>	79
II. Influencia de la temperatura de cultivo en la estructura de la pared celular de <i>K. marxianus</i>	92
a) Evaluación de la termotolerancia en medio sólido YPD agar.....	92
b) Cinéticas de crecimiento en medio líquido a diferentes temperaturas.....	94
c) Tolerancia al blanco de calcoflúor CFW a diferentes temperaturas	104
III. Desarrollo de un protocolo de transformación para cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i>	122
a) Estudio bibliográfico.....	122
b) Obtención del cassette Lac4-KanMx-Lac4.....	127
c) Análisis de la eficiencia de transformación y confirmación de disrupción de LAC4.	128
VI. Conclusiones.....	136
VII. Perspectivas	137
VIII. Referencias	139

IX. Anexos	151
X. Semblanza de Sara D. Sánchez.	162

Contenido de figuras

Figura 1. Ploidía celular.....	30
Figura 2. Papel del "mating-type switching" en el ciclo de vida de <i>S. cerevisiae</i> (Wolfe & Butler, 2022). Creada en BioRender.com.....	32
Figura 3. Análisis de ploidía en la cepa <i>K. marxianus</i> CBS 608.....	34
Figura 4. Árbol filogenético de los haplotipos de <i>K. marxianus</i>	36
Figura 5. Variación de la ploidía en cepas de <i>K. marxianus</i> . (Sticklen, 2008)..	38
Figura 6. Componentes de la pared celular de las levaduras (adaptada de Anwar et al., 2019).	42
Figura 7. Susceptibilidad de los mutantes de la pared celular de <i>Aspergillus niger</i> a CFW (200 mg/mL) o CR (150 mg/mL).	43
Figura 8. Construcción del plásmido pKLAC4-Cas9-Zeocina y vector linealizado en el genoma 4G5.....	47
Figura 9. Mecanismo de la NHEJ obtenido de BioRender.com.....	50
Figura 10. Sistema de selección de marcadores funcionales mediado por NHEJ en <i>K. marxianus</i> (Hoshida et al., 2014).	52
Figura 11. Clonación de ADN mediada por NHEJ en el plásmido de <i>K. marxianus</i> mediante selección de marcador funciona. (Hoshida et al., 2014b).	53
Figura 12. Representación esquemática del cassette lac4-KanMx-lac4 (Ribeiro et al., 2007).	66
Figura 13. Plásmido pUC18LAC4KanMx (Sabido, 2021).	68
Figura 14. Cassette lac4-KanMX-lac4 a partir del plásmido pUC18KanMxLac4. .	69
Figura 15. Gel de electroforesis de productos de PCR del <i>locus</i> MAT.....	80
Figura 16. Localización de los genes MAT en el genoma de la cepa Kmx 14.....	81

Figura 17. Localización de los genes MAT en el genoma de la cepa Kmx 15.....	82
Figura 18. Localización de los genes MAT en el genoma de la cepa Kmx 16.....	83
Figura 19. Localización de los genes MAT en el genoma de la cepa Kmx 22.....	84
Figura 20. Localización de los genes MAT en el genoma de la cepa Kmx 24.....	85
Figura 21. Árboles filogenéticos basados en las secuencias de nucleótidos de los genes MAT α 1 y MAT α 2 en cepas de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	89
Figura 22. Árboles filogenéticos basados en las secuencias de nucleótidos de los genes MAT α 1, MAT α 2 y MAT α 3 en cepas de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	91
Figura 23. Tolerancia de cepas de <i>K. marxianus</i> a diferentes temperaturas.....	93
Figura 24. Cinética de crecimiento por duplicado de las cepas de <i>K. marxianus</i> a 30°C durante 24 horas.	95
Figura 25. Tasa específica máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) en un tiempo determinado en función de la temperatura de cepas de <i>K. marxianus</i> a 30°C.	96
Figura 26. Cinética de crecimiento por duplicado de las cepas de <i>K. marxianus</i> a 37°C durante 24 horas.	97
Figura 27. Tasa específica máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) de cepas de <i>K. marxianus</i> a 37°C. Las barras verticales muestran la desviación estándar.....	97
Figura 28. Cinética de crecimiento por duplicado de las cepas de <i>K. marxianus</i> a 42°C durante 24 horas.	99
Figura 29. Tasa específica máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) de cepas de <i>K. marxianus</i> a 42°C. Las barras verticales muestran la desviación estándar.....	99
Figura 30. Cinética de crecimiento por duplicado de las cepas de <i>K. marxianus</i> a 45°C durante 24 horas. Se muestra la densidad óptica (DO _{600AB}) promedio.	100

Figura 31. Tasa específica máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) de cepas de <i>K. marxianus</i> a 45°C. Las barras verticales muestran la desviación estándar.	101
Figura 32. Cinética de crecimiento por duplicado de las cepas de <i>K. marxianus</i> a 48°C durante 24 horas.	102
Figura 33. Tasa específica máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) de cepas de <i>K. marxianus</i> a 48°C.	102
Figura 34. Susceptibilidad de las cepas de <i>K. marxianus</i> a diferentes concentraciones de CFW. A (0 mM), B (0.05mM), C (0.15mM), D (0.3mM), E (0.4mM) y F (0.5 mM) bajo diferentes temperaturas de incubación.	106
Figura 35. Susceptibilidad de las cepas de <i>K. marxianus</i> al CFW a diferentes temperaturas y concentraciones de CFW: A' (0 mM), B' (0.02mM), C' (0.05mM), D' (0.15mM), E' (0.2mM) y F' (0.5 mM) en diluciones seriadas de 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}	108
Figura 36. Sensibilidad a la liticasa de las cepas <i>K. marxianus</i> cultivadas a 30°C.	111
Figura 37. Tasas de lisis de las cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> que fueron cultivadas a 30°C.	111
Figura 38. Sensibilidad a la liticasa de las cepas <i>K. marxianus</i> cultivadas a 37°C.	112
Figura 39. Tasas de lisis de las cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> que fueron crecidas 37°C.	112
Figura 40. Sensibilidad a la liticasa de las cepas <i>K. marxianus</i> crecidas a 42°C.	113

Figura 41. Tasas de lisis de las cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> que fueron cultivadas a 42°C.	114
Figura 42. Sensibilidad a la liticasa de las cepas <i>K. marxianus</i> crecidas a 45°C.	115
Figura 43. Tasas de lisis de las cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> que fueron crecidas 45°C.	115
Figura 44. Tasas de lisis de las cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> que fueron crecidas a distintas temperaturas.	117
Figura 45. Confirmación de la obtención del cassette de disrupción Lac4-KanMx-Lac4.	128
Figura 46. Estructura de X-Gal y productos de hidrólisis (Julin, 2018).	132
Figura 47. Prueba de la interrupción del gen LAC4 en candidatas transformantes de CBS 6556.	133
Figura 48. Gen LAC4 en los genomas de las cepas Kmx 16 y Kmx 24. a) Kmx 16. b) Kmx 24.	135
Figura 49. Amplificación por PCR de la región ITS1-5.8 de candidatas transformantes de <i>K. marxianus</i>	152
Figura 50. Huella digital por PCR de los aislados de <i>K. marxianus</i> obtenidos con el cebador microsatélite (GTG) ₅	153
Figura 51. Crecimiento de cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> en presencia de CFW [0.05 mM-0.5 mM] a 30°C.	154
Figura 52. Crecimiento de cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> en presencia de CFW [0.05 mM-0.5 mM] a 37°C.	154

Figura 53. Crecimiento de cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> en presencia de CFW [0.05 mM-0.5 mM] a 42°C.	155
Figura 54. Crecimiento de cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> en presencia de CFW [0.05 mM-0.5 mM] a 45°C.	155
Figura 55. Crecimiento de cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> en presencia de CFW [0.02 mM-0.2 mM] a 30°C.	156
Figura 56. Crecimiento de cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> en presencia de CFW [0.02 mM-0.2 mM] a 37°C.	156
Figura 57. Crecimiento de cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> en presencia de CFW [0.02 mM-0.2 mM] a 42°C.	157
Figura 58. Crecimiento de cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> en presencia de CFW [0.02 mM-0.2 mM] a 45°C.	157

Contenido de tablas

Tabla 1. Aplicaciones biotecnológicas de levaduras.	27
Tabla 2. Aplicaciones biotecnológicas de cepas de <i>K. marxianus</i>	28
Tabla 3. Componentes de la pared celular de algunas especies de hongos y levaduras (Sticklen, 2008).	41
Tabla 4. Comparación de métodos para la transformación genética en levaduras. (He et al., 2017)	45
Tabla 5. Características de cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i>	55
Tabla 6. Componentes de la reacción de PCR del locus MAT α	57
Tabla 7. Componentes de la reacción de PCR del locus MATa.	57
Tabla 8. Parámetros del termociclador para la amplificación por PCR de los genes MAT.	58
Tabla 9. Mezcla de reacción la para amplificación por PCR del cassette lac4-KanMX-lac4 a partir del plásmido pUC18KanMxLac4.	68
Tabla 10. Condiciones de amplificación del cassette lac4-KanMx-lac4 a partir del plásmido pUC18KanMxLac4.	69
Tabla 11. Diferencias entre las condiciones de las pruebas de transformación de las cepas de <i>K. marxianus</i>	71
Tabla 12. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de KanMx.	74
Tabla 13. Parámetros del termociclador para la amplificación por PCR del gen KanMx.	74
Tabla 14. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de lac4-KanMx-lac4 en candidatas transformantes.	75

Tabla 15. Parámetros del termociclador para la amplificación por PCR del cassette lac4-KanMx-lac4 en candidatas transformantes.	75
Tabla 16. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de la región ITS5.8S de levaduras.	76
Tabla 17. Condiciones de amplificación de la PCR en termociclador para amplificar la región ITS.	76
Tabla 18. Coctel reacción para la amplificación por PCR de microsatélites en candidatas transformantes.	77
Tabla 19. Parámetros del termociclador para la amplificación por PCR del microsatélite GTG5.....	77
Tabla 20. Porcentajes de identidad de genes MAT de cepas autóctonas de <i>K. marxianus</i> con respecto a la cepa de referencia DMKU3-1042.	87
Tabla 21. Tasa específica máxima de crecimiento de las cepas de <i>K. marxianus</i> a diferentes temperaturas (h^{-1}).	103
Tabla 22. Análisis de varianza (ANOVA) de las tasas de lisis de <i>K. marxianus</i> crecidas a diferentes temperaturas.....	117
Tabla 23. Genes ortólogos implicados en la remodelación de pared celular encontrados en <i>K. marxianus</i> DMKU3-1042.....	120
Tabla 24. Protocolos de transformación de <i>K. marxianus</i> hallados en la literatura	122
Tabla 25. Protocolos de quimiotransformación mediada por LiAc/PEG/ssDNA...124	
Tabla 26. Cantidad total de ADN obtenido.....	128

Tabla 27. Condiciones y resultados de pruebas de quimiotransformación mediada por LiAc/ssDNA/PEG utilizando el cassette de disrupción Lac4-KanMx-Lac4.....129

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNg: ADN genómico

ADNp: ADN plasmídico

Amp: Ampicilina

ARN: Ácido ribonucleico

Cb: Carbenicilina

CFW: Blanco de calcoflúor (por sus siglas en inglés Calcofluor White)

CR: Rojo Congo (por sus siglas en inglés Congo Red)

DSB: Doble ruptura en la doble cadena de ADN (por sus siglas en inglés Double-Strand Break)

DO_{600nm}: Densidad óptica a 600 nanómetros

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

G418: Geneticina

LiAc: Acetato de litio

MW: Peso molecular (por sus siglas en inglés Molecular Weight)

NHEJ: Unión de extremos no homólogos (por sus siglas en inglés Non-Homologous End Joining)

PEG: Polietilenglicol

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

ssDNA: ADN monocatenario (por sus siglas en inglés single-stranded DNA)

TAE: Tris-acetato-EDTA

TBE: Tris-borato-EDTA

Trc: Tetraciclina

UFC: Unidades formadoras de colonias

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

YPD: Extracto de levadura, peptona y dextrosa

μ_{max} : Tasa de crecimiento específica máxima

Capítulo I. Introducción

Las levaduras tienen una rica historia que se remonta a las civilizaciones antiguas y al mismo tiempo tienen un prometedor futuro en el campo de la biotecnología (Johnson & Echavarri-Erasun, 2011). En años recientes han surgido nuevas y diversas aplicaciones de las levaduras en áreas como la alimentación humana y animal, la producción de biocombustibles, biocatálisis, la producción de proteínas terapéuticas, biomedicina, biocontrol y biorremediación (Reina-Posso & Gonzales-Zubiate, 2025). El número de especies de levadura descritas aumenta cada año, pero las aplicaciones biotecnológicas o industriales se limitan a un pequeño número de especies (Tabla 1), principalmente en *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, que son consideradas como levaduras modelo (Bilal et al., 2022).

Entre las levaduras no convencionales o no-*Saccharomyces*, están las especies *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Scheffersomyces stipitis*, *Hansenula polymorpha* y *Rhodotorula toruloides* (Patra et al., 2021). A diferencia de *S. cerevisiae* y *S. pombe*, aún se carece de información importante sobre su morfología, fisiología y genética. A medida que las aplicaciones en el sector de la biotecnología continúan desarrollándose, existe un interés creciente en la aplicación de herramientas moleculares modernas para comprender, manipular y mejorar a las llamadas levaduras "no convencionales" como es el caso de *K. marxianus* (Bilal et al., 2022).

Tabla 1. Aplicaciones biotecnológicas de levaduras.

Aplicación	Levadura	Referencia
Producción de insulina, análogos de insulina y glucagón, hormonas, vacunas (antígeno de superficie del virus de la hepatitis B) y partículas similares a virus (Virus like particules, <i>VLP</i>).	<i>S. cerevisiae</i>	Sanchez-Garcia et al., 2016
Producción de ácido láctico	<i>S. cerevisiae</i>	Saitoh et al., 2005; Ostos Ortiz et al., 2019
Producción de α -Galactosidasa	<i>Saccharomyces</i> spp	Johnson & Echavarri-Erasun, 2011a; Mustafa, 2014
Producción de lipasas	<i>Candida rugosa</i> , <i>Pseudozyma antarctica</i> A, B, <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Trichosporon fermentum</i> y <i>Yarrowia lipolytica</i>	Johnson & Echavarri-Erasun, 2011a; Mustafa, 2014
Producción de quimosina	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Johnson & Echavarri-Erasun, 2011a; Mustafa, 2014
Producción de aminoácidos que incluyen lisina, metionina, fenilalanina y prolina	<i>S. cerevisiae</i> y <i>Rhodotorula glutinis</i>	Gupta et al., 2014
Producción de astaxantina	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> , <i>Phaffia rhodozyma</i>	Gupta et al., 2014
Industria panificadora	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>S. bayanus</i> y <i>S. carlsbergensis</i> .	Gupta et al., 2014
Producción de β -caroteno	<i>Phaffia rhodozyma</i> <i>Rhodotorula</i> spp.	Gupta et al., 2014

La levadura no convencional *K. marxianus* posee características deseables para diversas aplicaciones biotecnológicas (Tabla 2) como la capacidad de fermentar y

asimilar diversos azúcares además de la glucosa; una alta tasa de crecimiento, con tiempos de generación típicos de ~70 min; termotolerancia de hasta 52 °C; y una notable capacidad de secretar enzimas (Karim et al., 2020). Para aprovechar al máximo esta levadura y sus propiedades particulares, se necesitan herramientas adecuadas de caracterización molecular e ingeniería genética. La disponibilidad de nuevas herramientas y recursos moleculares para *K. marxianus*, junto con sus interesantes características metabólicas y celulares, así como su potencial de convertirse en una nueva plataforma para diversos procesos biotecnológicos, respalda firmemente la necesidad de profundizar en la investigación de esta especie en particular (Baptista & Domingues, 2022).

Tabla 2. Aplicaciones biotecnológicas de cepas de *K. marxianus*.

Producción de	Cepa	Referencia
Inulinasa	YS-1, DMKU 3–1042	Karim et al., 2020; Singh et al., 2007
β - galactosidasa	Km 15, CCT 7082	Karim et al., 2020; Zhou et al., 2013
β - xilosidasa	*NE	Rajoka, 2007
Lipasa	CECT 1018	Deive et al., 2003
Poligalacturonasa	<i>K. marxianus</i> 166	Da Silva et al., 2005
2-feniletanol (2-PE)	*NE	Conde-Báez et al., 2016
Acetato de etilo	DSM 5422	Löser et al., 2013
Acetato de isoamilo	*NE	Hoşoğlu, 2018
Aditivo para piensos	*NE	Leonel et al., 2021

*NE: No especificada

Gran parte del conocimiento subyacente sobre la biología de *K. marxianus* se basa en la inferencia de similitud con su especie hermana, *Kluyveromyces lactis*, que ha sido un modelo para discernir entre aislados lácteos de no lácteos desde la década

de 1960 (Fukuhara, 2006; Ortiz-Merino et al., 2018). Aunque esta especie resulta útil, existen diferencias metabólicas y fisiológicas entre *K. lactis* y *K. marxianus* necesitan estudios específicos e independientes de esta última para lograr una comprensión completa de su genética y fisiología. Esto es fundamental para respaldar futuros avances en la biología básica y la biotecnología de la especie (Ortiz-Merino et al., 2018). En este estudio se utilizaron siete aislados de *Kluyveromyces marxianus* obtenidos de diferentes etapas de producción de bebidas fermentadas tradicionales mexicanas: pulque artesanal (Estado de Hidalgo) y mezcal de henequén (Estado de Yucatán). Estas levaduras fueron previamente recuperadas y conservadas en la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biología de la UNAM, y representan una fuente relevante de diversidad genética por su adaptación a condiciones ambientales contrastantes y sus potenciales propiedades biotecnológicas (Lappe-oliveras et al., 2023).

A pesar de los esfuerzos realizados hasta ahora, se requieren más estudios genéticos, como análisis del genoma para identificación de genes clave junto con análisis fenotípicos, que permitan aprovechar al máximo aprovechamiento de cepas de *K. marxianus* (Perpetuini et al., 2019). Además, es importante profundizar en algunas características poco estudiadas, como la estructura de su pared celular y los genes asociados a la síntesis de sus componentes, ya que de esta conformación dependen otras propiedades importantes, tales como la termotolerancia, rápido crecimiento, capacidad de captar ADN foráneo (transformación) y resistencia a diversos tipos de estrés en cultivos.

Capítulo II. Antecedentes

Ploidía

Un aspecto importante en los estudios de biología molecular en organismos eucariontes, es la ploidía celular. Se refiere al número de conjuntos completos de cromosomas presentes en una célula. Muchas especies eucariontes pueden ser haploides, con un solo conjunto de cromosomas; diploides, con dos conjuntos; o poliploides, con más de dos conjuntos (figura 1a) (Otto & Whitton, 2000; Todd et al., 2017).

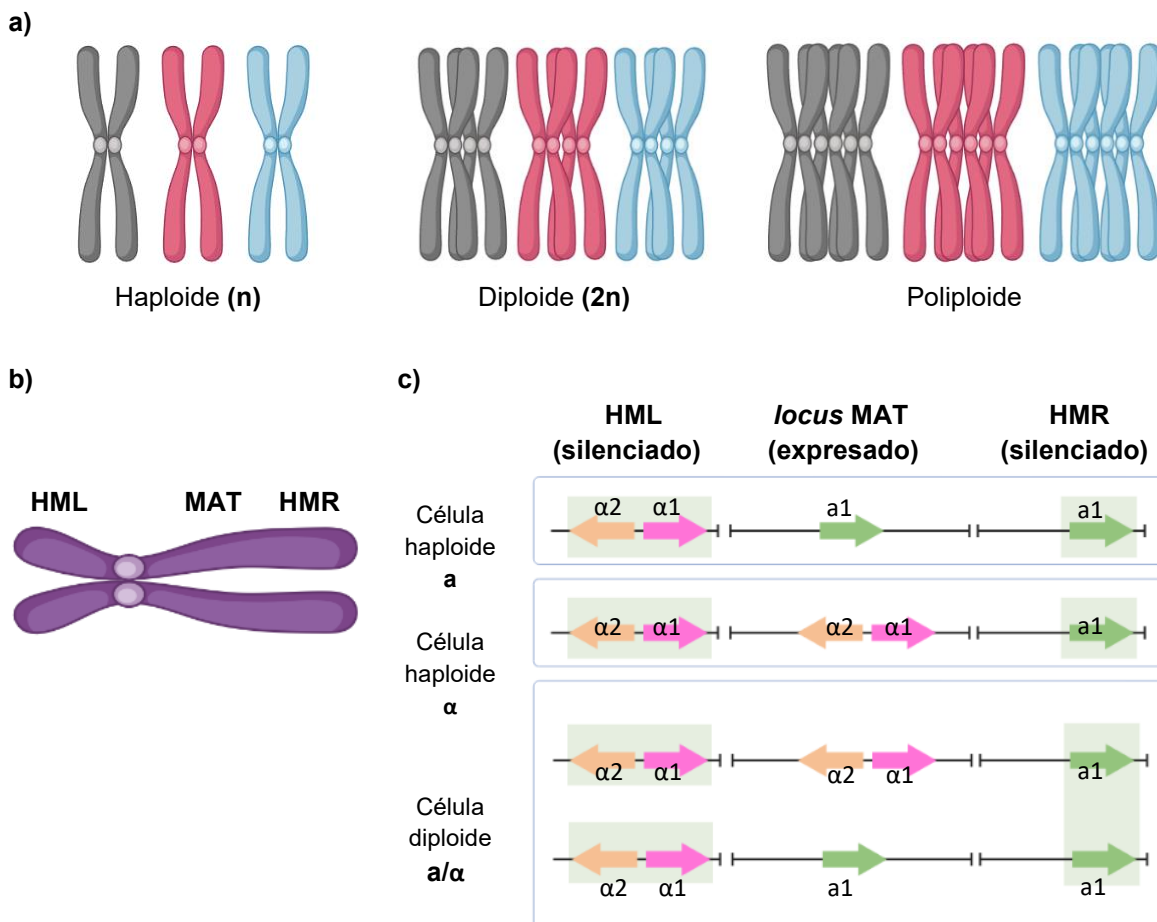


Figura 1. Ploidía celular. a) Nivel de ploidía celular en *S. cerevisiae*, b) Cromosoma III de *S. cerevisiae* y c) Locus MAT de *S. cerevisiae*.

La estructura del genoma y la ploidía varían entre las diferentes especies de levaduras. No obstante, existe una fuerte conservación evolutiva del locus de apareamiento (*mating type*) conocido como locus MAT (Lane et al., 2011; Ortiz-Merino et al., 2018). En la levadura *S. cerevisiae*, un organismo modelo eucariota, las células pueden existir en dos estados de ploidía: haploide (n) o diploide (2n). En el estado haploide, las células poseen uno de dos tipos de apareamiento, los cuales son MATa o MAT α . Las células haploides MATa expresan genes que codifican un péptido llamado factor a, que es secretado como una feromona de señalización. Estas células también expresan receptores en su membrana plasmática que detectan el factor α , producido por las células MAT α . Por su parte, las células MAT α secretan el factor α . Esta comunicación molecular permite el reconocimiento entre células de tipos opuestos y desencadena la conjugación sexual para formar una célula diploide. Las células diploides (MATa/ MAT α) resultantes no secretan feromonas y no responden a señales de apareamiento, ya que su objetivo principal es crecer por mitosis bajo condiciones normales (Storchova, 2014).

A nivel genético, el *locus* MATa contiene a los genes a1 y a2, mientras que el *locus* MAT α contiene a los genes α 1, α 2 y α 3 (Lee et al., 2018). Estos genes codifican principalmente factores de transcripción, y desempeñan un papel central en la regulación de la expresión génica relacionada con el tipo sexual. Interesantemente, el locus MAT presenta regiones conservadas entre especies evolutivamente distantes, conocidas como “Caja HMG” y “Caja alfa”; las cuales corresponden a motivos de unión al ADN, lo que respalda su función como reguladores transcripcionales (Conde-Ferrández, 2007). *S. cerevisiae* se mantiene como el modelo

más representativo para el estudio funcional y evolutivo de los genes del locus MAT, ubicados en el cromosoma III (Figura 1b).

Los tipos de células sexuales de levadura, denominados a y α , son conferidos correspondientemente por los alelos MAT a y MAT α del *locus* del tipo de apareamiento (MAT). Las células de tipo opuesto pueden aparearse para establecer una célula MAT α / MAT a , debido a que ambos alelos MAT son codominantes, tales células diploides. Debido a que ambos pueden sufrir meiosis estas células son estériles y esporulan para formar ascas, cada una de los cuales contiene dos esporas haploides MAT a y dos MAT α . Los haploides MAT a y MAT α pueden cambiar su tipo de apareamiento.

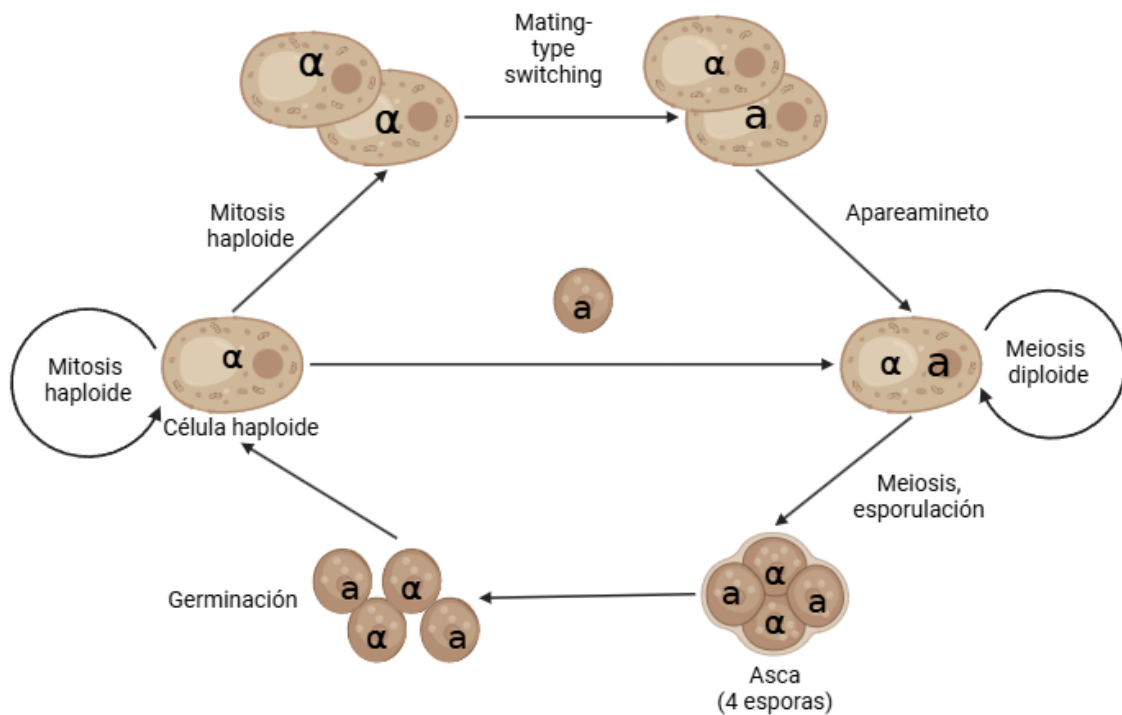


Figura 2. Papel del "mating-type switching" en el ciclo de vida de *S. cerevisiae* (Wolfe & Butler, 2022). Creada en BioRender.com

Este fenómeno, conocido como cambio de tipo de apareamiento (*mating type switching*), consiste en la capacidad de una célula haploide de *S. cerevisiae* para alternar entre los tipos MATa y MAT α (Figura 2). Dicho cambio posibilita que una célula haploide genere descendencia diploide al aparearse con células genéticamente idénticas que ha cambiado de tipo sexual, lo cual es especialmente relevante en poblaciones derivadas.

El cambio de tipo está mediado por un mecanismo preciso de recombinación genética dirigida, en el cual se reemplaza la información del locus MAT activo con una copia proveniente de loci silenciados: HML α (contiene genes MAT α) o HMRa (contiene genes MATa). De esta forma, la célula puede reprogramar su identidad sexual de forma eficiente (Haber, 2012).

El mecanismo mencionado, confiere una ventaja adaptativa importante, que permite a poblaciones haploides homogéneas generar células diploides sin requerir un compañero sexual distinto, facilitando la reproducción sexual en condiciones de aislamiento. Además, promueve la variabilidad genética y la resistencia a condiciones ambientales adversas, factores clave para la supervivencia y evolución de la especie (Haber, 2012).

Ploidía de *K. marxianus*

El nivel de ploidía dentro del género *Kluyveromyces* no se ha resuelto completamente, aunque se estableció que la mayoría de las especies son homotáticas y se pueden dividir en grupos de apareamiento (Lane & Morrissey,

2010). Se sugiere, por ejemplo, que la ampliamente utilizada cepa *K. marxianus* CBS 6556 (Y-665) podría ser diploide (Fonseca et al., 2008; O. Ribeiro et al., 2007).

Los enfoques moleculares indican que algunas cepas de *K. marxianus* son haploides, por lo tanto es probable que tanto la forma haploide como la diploide existen en la naturaleza y en entornos industriales y de investigación. Lane et al., (2011) reporta que, de las 13 cepas investigadas, las 3 cepas NCYC 100, NCYC 111 y CBS 608 provenientes de *National Collection of Yeast Cultures Norwich (NCYC), UK* y del *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, The Netherlands (CBS)* respectivamente, son diploides mientras que las cepas NCYC 179, CBS 397, CBS 745, NCYC 1421, NCYC 2597, NCYC 2791, NCYC 587, CBS 7858 NCYC 970 y CBS 2887 son haploides (Figura 3).

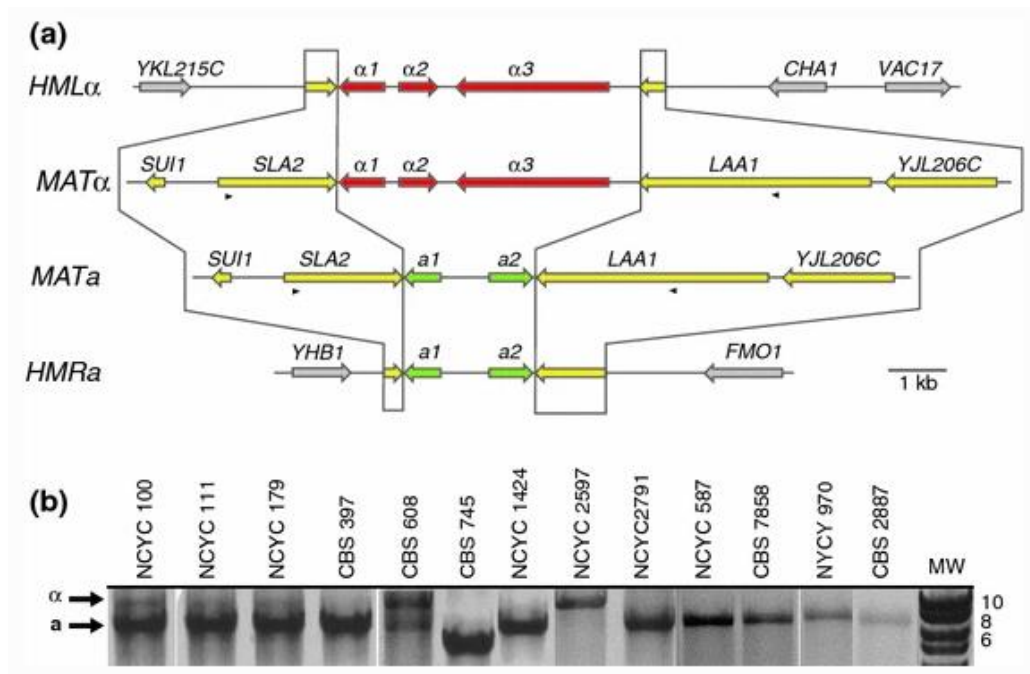


Figura 3. Análisis de ploidía en la cepa *K. marxianus* CBS 608 **(a)** Reconstrucción de las regiones MAT, HML y HMR de la cepa *K. marxianus* CBS 608. **(b)** Bandas correspondientes a MATa o MAT α en 13 cepas de *K. marxianus* amplificadas por PCR utilizando los oligonucleótidos indicados por las flechas negras. Los cassetes de

apareamiento silencioso están denotados por las siglas HML α y HMR α . SLA2 y LAA1 son genes ortólogos de *K. lactis*. Tomado de Lane et al., (2011).

En un estudio realizado por Lane et al., (2011) se determinó la ploidía de la cepa CBS 608 de *K. marxianus* mediante el análisis del *locus* MAT. Para ello se utilizó una secuencia del genoma de CBS 608 para reconstruir las regiones MAT, HML y HMR. Es importante señalar que las regiones HML y HMR son silenciadas, es decir, inactivas. Esto se debe a que ambas regiones están rodeadas por un par de secuencias silenciadoras relacionadas pero distintas, denominadas HML-E, HML-I, HMR- E y HMR-I, que, aunque relacionadas, son distintas. Estos elementos, junto con otras proteínas como Sir y Rap1, así como modificadores de cromatina, reprimen la transcripción de HML y HMR (Haber, 2012). El borrador del ensamblaje del genoma que se observa en la Figura 3, indicó que CBS 608 es una cepa diploide, se identificaron que tanto los *loci* MAT α como MAT α , ambos flanqueados por copias completas de los genes SLA2 y LAA1, lo cual corresponde al contexto genómico esperado de estos *loci* no silenciados.

Tres cepas más, NCYC 100,111 y 179 de *K. marxianus* también fueron diploides y las nueve cepas restantes haploides. De éstas, siete amplificaron una sola banda de un tamaño consistente con el *locus* MAT α , y NCYC 2597 amplificó una banda consistente con el *locus* MAT α . CBS 745 también es haploide tipo *a* y parece contener una delección de aproximadamente 1 kb en el *locus* MAT, pero esto no se investigó más en este estudio (Figura 3).

Las cepas haploides, en general, más fáciles de manejar para la mayoría de los análisis moleculares y las construcciones genéticas. Ortiz-Merino et al., (2018) mencionan que, aunque es posible que los diploides presenten algunas ventajas

(como una mayor capacidad para metabolizar lactosa), estas aún no han sido completamente demostradas. En organismos diploides, que poseen dos copias de cada cromosoma, puede existir una mayor flexibilidad en la expresión génica, lo cual podría influir en la eficiencia en el metabolismo de la lactosa, dependiendo de las variantes de los genes involucrados (Figura 4).

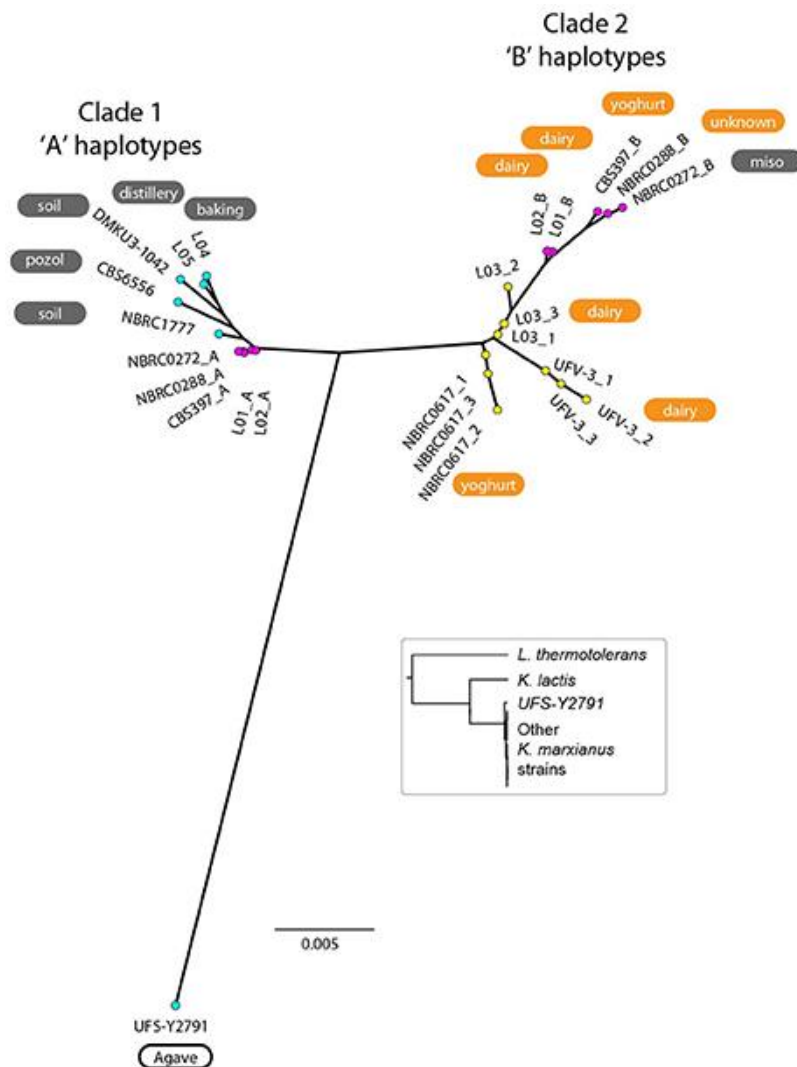


Figura 4. Árbol filogenético de los haplotipos de *K. marxianus*. Los puntos de colores indican la ploidía de las cepas como haploide (azul; 1 haplotipo por cepa), diploide (rosa; 2 haplotipos por cepa) o triploide (amarillo; 3 haplotipos por cepa). Se muestra la fuente ambiental de cada cepa (para las cepas diploides la fuente solo está etiquetada en el haplotipo "B"). Los fondos anaranjados indican cepas *Lac*⁺, los fondos grises indican cepas *Lac*⁻ y los fondos blancos indican fenotipos *Lac* no evaluados.

Las cepas haploides son mucho más fáciles de manipular por ingeniería genética, por lo que, para la mayoría de las aplicaciones biotecnológicas, suele ser preferible elegir cepas haploides tipo α , que es el tipo más común. Sin embargo, los alelos divergentes (haploides tipo α) también pueden ser importantes desde el punto de vista funcional. Por estas razones es de interés determinar la ploidía de las cepas utilizadas en este proyecto, ya que puede influir en la manipulación genética, las propiedades fenotípicas y la clasificación taxonómica de las mismas. En varios estudios han informado que *K. marxianus* tiene 8 cromosomas con muchas regiones de sintenia (conservación del orden de los genes en el cromosoma) entre especies. Existe una fuerte conservación del *locus* MAT dentro de esta especie (Lane et al., 2011; Ortiz-Merino et al., 2018) y se sugiere que, al igual que *K. lactis* y *S. cerevisiae*, *K. marxianus* es capaz de cambiar el tipo sexual (Barsoum et al., 2010; Ortiz-Merino et al., 2018; Rajaei et al., 2014).

El *locus* MAT de *K. marxianus* es homólogo al de *K. lactis* (Butler et al., 2004; Lee et al., 2018; Ström & Rine, 1998) en el que la estabilidad de las células haploides depende de la actividad de la $\alpha 3$ transposasa (Barsoum et al., n.d.; Lee et al., 2018). En un estudio realizado por Lee et al., (2018), obtuvieron cepas haploide estables de *K. marxianus* 4G5 a partir de la esporulación de cepas diploides a las que se le realizó una interrupción (*knockout*) de MAT $\alpha 3$ utilizando el sistema CRISPR/Cas9. Este estudio reveló que es posible eliminar el gen MAT $\alpha 3$ del contexto diploide evitando cambios descontrolados en el tipo sexual.

Otra estrategia molecular empleada para determinar la ploidía de cepas pertenecientes a *K. marxianus* fue la desarrollada por Ortiz-Merino et al., (2018) en

la que se midió el contenido de ADN en cada cepa mediante citometría de flujo. Cada cepa analizada mostró una distribución bimodal del contenido de ADN, correspondiente a las fases G1 y G2 del ciclo celular. Para las cepas haploides, el contenido de ADN es 1 n (en fase G1) y 2 n (en fase G2), donde n es el contenido de ADN del genoma haploide. Para los diploides es 2 n y 4 n, y para los triploides es 3 n y 6 n (Figura 3). Los patrones observados fueron consistentes con la designación basada en frecuencias de alelos y confirmaron que este conjunto de cepas estaba compuesto por 6 cepas haploides, 5 diploides y 3 triploides.

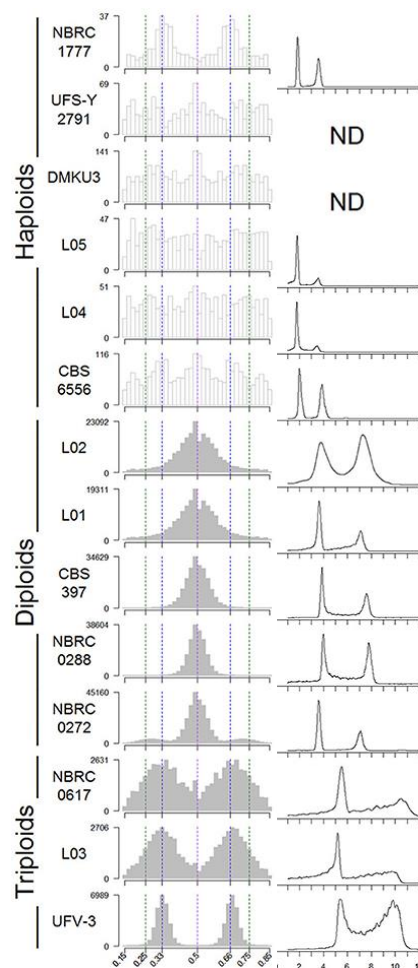


Figura 5. Variación de la ploidía en cepas de *K. marxianus*. (Sticklen, 2008). Citometría de flujo del contenido de ADN en cada cepa. La clave de las cepas se muestra a la izquierda.

En suma, la determinación del estado de ploidía es un paso fundamental para comprender la biología celular y el potencial biotecnológico de las levaduras. Entre las herramientas disponibles, la PCR dirigida a *loci* asociados al tipo de apareamiento se ha consolidado como una técnica accesible, precisa y adaptable a diversas especies, lo que la convierte en una alternativa eficiente frente a métodos más complejos como la citometría de flujo. En el presente estudio, la aplicación de PCR en cepas autóctonas de *K. marxianus*, permitió caracterizar su ploidía, lo cual es crucial dada la plasticidad genómica de esta especie y su creciente interés industrial.

Determinar con precisión el estado haploide o diploide de estas cepas no solo aporta conocimiento básico sobre su ciclo de vida, sino que también sienta las bases para futuras aplicaciones en ingeniería genética, mejora de cepas, fermentación optimizada y producción de compuestos de interés comercial, como los mencionados con anterioridad. La ploidía influye directamente en la estabilidad genética, la expresión de características deseables y la capacidad de las levaduras para adaptarse a condiciones industriales, por lo que su análisis constituye un aspecto estratégico en el desarrollo de procesos biotecnológicos eficientes y sostenibles.

Pared celular de levaduras

La pared celular es una estructura compleja que rodea la membrana plasmática de las células de vegetales, hongos, algas y bacterias, proporcionando resistencia a la tracción y protección contra el estrés mecánico y osmótico (Sticklen, 2008). El entrecruzamiento de sus componentes varía según la especie y es esencial para su

integridad y composición. Normalmente está compuesta de una matriz rígida de polisacáridos, lípidos y proteínas (Freeman, 2009). Esta estructura se remodela continuamente a medida que las células experimentan la división celular, el apareamiento, la gametogénesis o se adaptan a factores ambientales (Novačić et al., 2020). Además, la pared celular es la principal barrera para la captación de ADN exógeno, por lo que el estudio de su estructura y respuesta a factores externos es sumamente importante para llevar a cabo técnicas de biología molecular como la transformación, es decir, la introducción de ADN exógeno (Kawai et al., 2010). El conocimiento sobre la estructura de la pared celular de la levadura ha contribuido significativamente a una mejor comprensión a nivel molecular del crecimiento, la reproducción, la formación de protoplastos, la autólisis, la floculación, entre otros (Fleet, 1985). Las paredes de las células de levadura tienen dos funciones principales: preservar la integridad física de la célula y facilitar la comunicación con las moléculas y células circundantes. Mientras que la primera función requiere la síntesis de redes de polisacáridos conservados evolutivamente, la segunda demanda flexibilidad para adaptarse a diferentes hábitats y estilos de vida (Lozančić et al., 2021).

La pared de las levaduras se compone principalmente de una red de β -(1,3)-d-glucano con cantidades menores de β -(1,6)-d-glucano y quitina (Figura 6) (Hartland et al., 1994; Lozančić et al., 2021). La proporción de éstos y otros componentes puede variar según la especie de levadura, el medio de cultivo, el pH, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno y fase de crecimiento (Galinari et al.,

2017). En la tabla 3 se enlistan los componentes de la pared celular de algunas especies de levaduras y hongos reportados en la literatura (Sticklen, 2008).

Tabla 3. Componentes de la pared celular de algunas especies de hongos y levaduras (Sticklen, 2008).

Componente	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Quitina	1-2%	2-6%	7-15%	4%	0%
β -(1,3)-d-glucano	50-55%	30-39%	20-35%	87%	
β -(1,3/1,4)-glucano mixto	Sin presencia	Sin presencia	Presencia	Posiblemente	Sin presencia
β -(1,6)-d-glucano	10-15%	43-53%	0%	0%	0%
α -(1,3)-glucano	0%	0%	35-46%	Pared celular conidial	18-28%
Manano cadena exterior	10-20%	38-40%	0%	0%	0%
Galactomanano	0%	0%	20-25%	12%	9-14%

A lo largo del tiempo se ha estudiado a profundidad a la levadura modelo *S. cerevisiae*. Algunas investigaciones que combinan de perfiles transcripcionales con estudios de bioquímica han proporcionado amplia evidencia de que la pared celular es un orgánulo altamente adaptable (Klis et al., 2006). Su composición promedio incluye aproximadamente de 50 a 55% de β -(1,3)-d-glucano, 5–10% de β -(1,6)-d-glucano, 35-40% de complejos manoproteicos y 2% de quitina (Galinari et al., 2017; Kwiatkowski et al., 2009).

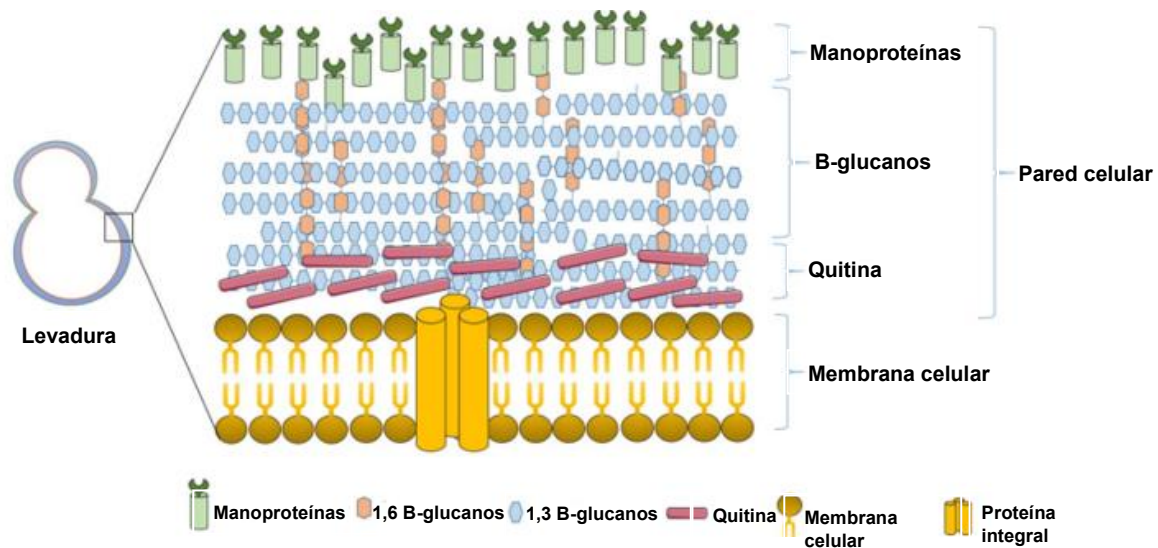


Figura 6. Componentes de la pared celular de las levaduras (adaptada de Anwar et al., 2019).

La composición macromolecular, organización molecular y grosor de la pared celular de *S. cerevisiae* varían dependiendo de las condiciones ambientales. Además, su arquitectura está estrictamente controlada espacial como temporalmente, por lo que muchos genes están involucrados en su configuración (FJ-Ram & Klis, 2006). Cuando este microorganismo se enfrenta a condiciones de estrés que afectan a la pared celular, se observa una respuesta transcripcional al estrés, a la vía de integridad de la pared celular y a la vía de la calcineurina (Lane et al., 2011). Este mecanismo incluye una mayor expresión de genes encargados del ensamblaje de la pared celular y de cambios cruciales en su arquitectura (Klis et al., 2006).

Ram y Klis (2006) establecieron un método sencillo para identificar los genes implicados en la remodelación de la pared celular en hongos basado en el fenotipo de sensibilidad frente a colorantes aniónicos, el blanco de calcoflúor (CFW) y el rojo Congo (CR), los cuales interfieren con la construcción y la respuesta al estrés de la

pared celular. La sensibilidad de los hongos a CFW y CR se evaluó mediante la determinación de unidades formadoras de colonias en presencia y ausencia de estos colorantes (Figura 5).

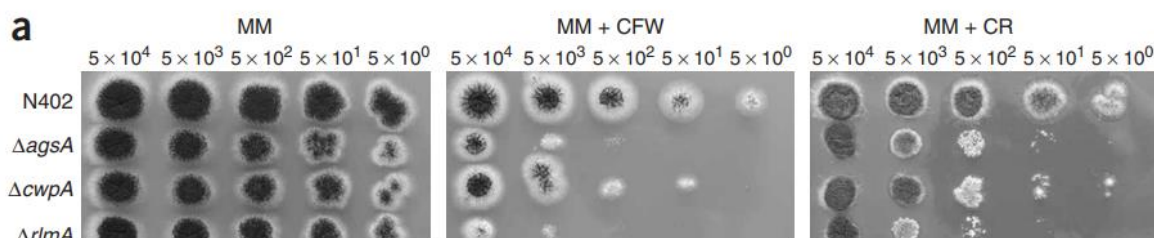


Figura 7. Susceptibilidad de los mutantes de la pared celular de *Aspergillus niger* a CFW (200 µg/mL) o CR (150 µg/mL). MM es el control sin colorantes CFW y CR. FJ-Ram & Klis (2006).

Pared celular de *K. marxianus*

En la actualidad pocos estudios han investigado la composición de la pared celular de *K. marxianus*. En Vallejo et al., (2012), mencionan que los principales componentes de la pared celular de *K. marxianus* destacan los (1,3)-β-D-glucanos y α-D-mananos. En un estudio más reciente Alcazar et al., (2016) estos autores realizaron la extracción y cuantificación de los polisacáridos presentes en la pared celular de esta levadura. Además de confirmar la presencia de 1,3 β-glucanos y 1,6 β-glucanos, también se identificaron mananos y quitina, incluso observaron que *K. marxianus* presentaba una concentración mayor de 1,3 β-glucanos y mananos en comparación con una cepa de *S. cerevisiae*.

Actualmente, no existen reportes sobre los genes implicados en la síntesis de componentes de pared celular en *K. marxianus*. Sin embargo, esta información está bien documentada en la levadura modelo *S. cerevisiae*. En una investigación realizada por Ribeiro et al., (2021) se investigaron las alteraciones que ocurren a nivel de la pared celular durante la adaptación de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*

a una exposición repentina a ácido acético. Estos autores analizaron los niveles de ARNm de los genes RLM1, FKS1, FKS2, BGL2, CHS3, CRH1, GAS1 y PRM5 mediante transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR). Los resultados mostraron un ligero aumento en la transcripción de GAS1, gen que codifica una β -1,3-glucanosiltransferasa responsable de la elongación de las cadenas de (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucano como respuesta a la presencia de ácido acético.

Transformación en levaduras

La transformación del ADN es una técnica fundamental en la ingeniería genética (Lyu et al., 2021). En la actualidad, se han desarrollado diferentes procedimientos de ingeniería genética y biología molecular con la finalidad de introducir moléculas exógenas en el interior de una célula (Hernández & Martínez, 2012). La transformación genética consiste en la transferencia e incorporación de ADN extraño libre en una célula huésped (Kidwell, 2005).

Algunos de los métodos de transformación mayormente empleados en la investigación son: la transformación directa de ADN en protoplastos, la biobalística o bombardeo con microproyectiles, la electroporación (Hernández & Martínez, 2012), la transformación mediada por *Agrobacterium* (AMT), la transformación mediada por ondas de choque (SWMT) (Li et al., 2017a) y la quimiotransformación, que utiliza cloruro de calcio en bacterias o con acetato de litio en levaduras, entre otros. La elección de uno u otro método depende en gran medida del objetivo final del experimento, de la disponibilidad de los equipos pertinentes y del tipo de célula empleada (Hernández & Martínez, 2012). En un trabajo realizado por He et al., (2017) se revisó el desarrollo de los métodos utilizados para la transformación

genética de hongos, considerando que las levaduras forman parte del reino Fungi. En la tabla 4 se señalan las ventajas y desventajas de la elección de cada método.

Tabla 4. Comparación de métodos para la transformación genética en levaduras. (He et al., 2017)

Método	Ventajas	Desventajas
Protoplasto mediado por PEG/CaCl₂	Se pueden utilizar diferentes tipos de células (conidios, micelio).	Procedimientos complicados y baja tasa de generación de protoplastos.
Acetato de litio	No depende de un protoplasto	Procedimiento complicado
Biobalística	La pared celular no requiere un pretratamiento. Independiente de las propiedades fisiológicas del hongo	Equipos costosos y optimización tediosa de varios factores.
Electroporación	Simple, rápido y barato. Genoma asignado aleatoriamente	Depende de las características electrofisiológicas del hongo. Aumenta la tasa de muerte celular.
Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Se pueden utilizar diferentes tipos de células (conidios, micelio). No requiere formación de protoplastos.	Pérdida de tiempo. Requiere una tediosa optimización de varios factores durante el cocultivo.
Transformación mediada por liposomas	Método efectivo, rápido y simple	Alta toxicidad, menor eficiencia de transfección e inestabilidad extracelular del complejo de entrega.
Vectores virales	Método efectivo, rápido y simple	Altamente inmunogénico, relativamente difícil de producir.

Transformación de *K. marxianus*

La levadura *K. marxianus* es una fábrica celular de interés para la producción de bioetanol, compuestos aromáticos y proteínas heterólogas, y representa una

plataforma para aplicaciones de biología sintética prometedora. Esto se debe a su *estus* GRAS (*Generally Recognized As Safe*) y características de rápido crecimiento y termotolerancia. Sin embargo, la investigación básica y las aplicaciones biotecnológicas de esta especie, están limitadas por la ausencia de métodos eficientes y estandarizados para la transformación e integración de genes eficientes (Lyu et al., 2021).

La introducción de ADN exógeno en diversas cepas de *K. marxianus* se ha logrado mediante técnicas como la electroporación, transformación de protoplastos (Lyu et al., 2021), y transformación con acetato de litio, utilizando protocolos adaptados de organismos más estudiados como *S. cerevisiae* y *K. lactis*. Lane & Morrissey (2010), mencionan que la construcción de cepas recombinantes estables requiere la integración del ADN en el cromosoma, ya sea para hacer mutantes definidos que carezcan de un gen específico, o para introducir nuevos rasgos. Gombert et al., (2016), señalan que el enfoque más sencillo para lograr integraciones aleatorias consiste en la transformación con ADN lineal o plásmidos linealizados que tienen regiones homólogas para la recombinación. Con este enfoque, se pueden integrar una o múltiples copias de ADN transformado en los cromosomas de la levadura. No obstante, hasta donde sabemos, no se han realizado ningún estudio sistemático en *K. marxianus* que determine cuántas copias de ADN exógeno se integran en los cromosomas. Tampoco se sabe cuál es número de pares de bases homólogas mínimo para la recombinación.

Aunque aún no existe un protocolo de transformación estandarizado o exclusivo para *K. marxianus*, protocolos elaborados para su levadura hermana *K. lactis* han

sido reportados desde 1993. Estos protocolos se basan en la transformación mediante acetato de litio en presencia de ditioneitol (DTT) y con un choque térmico a 47°C.

En un estudio realizado por Lee et al., (2018) se implementó un protocolo de transformación por electroporación basado en la levadura *K. lactis* (Sánchez et al., 1993; Lee et al., 2018) en cepas de *K. marxianus*. Para ello un fragmento de ADN de 5 µg del plásmido pKLAC4-Cas9-Zeocina se linealizó con la enzima de restricción *Sac-II* y se electroporó en células competentes de *K. marxianus* 4G5 (Figura 6).

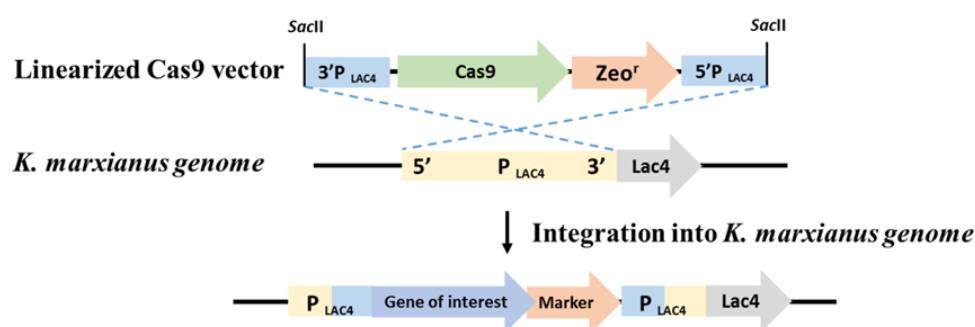


Figura 8. Construcción del plásmido pKLAC4-Cas9-Zeocina y vector linealizado en el genoma 4G5. (a) Mapa de pKLAC4-Cas9-Zeocina. (b) Transformación del vector linealizado en el genoma 4G5.

Recientemente, Lyu et al., (2021) optimizaron un método de transformación de protoplastos en *K. marxianus*. Los protoplastos, son células de levaduras a las cuales se les ha removido completamente la pared celular y como resultado el contenido celular queda encapsulado por la membrana celular (Alcazar et al., 2016). La eficiencia final reportada fue de 1.8×10^4 transformantes por gramo de ADN, que es 18 veces mayor que la eficiencia de transformación obtenida por el método de acetato de litio. Para validar la técnica los autores utilizaron plásmidos de distintos

tamaños, 10, 24 y 58 kb. Todos los plásmidos se transformaron exitosamente en *K. marxianus*, demostrando la eficiencia del método optimizado.

Contar con un protocolo de transformación estandarizado y eficiente para cepas autóctonas de *K. marxianus* representaría un avance clave en su aprovechamiento biotecnológico. Esta especie no convencional destaca por su termotolerancia, rápida tasa de crecimiento, capacidad de utilizar una amplia gama de sustratos y elevada plasticidad genómica, características que la hacen especialmente atractiva para su aplicación en sectores como la industria alimentaria, bioenergética, farmacéutica y en la producción de enzimas o metabolitos de interés.

La disponibilidad de herramientas moleculares que permitan la modificación genética controlada (como protocolos adaptados a modificaciones genéticas y fisiológicas) es fundamental para su mejora dirigida. Esto posibilita, entre otras aplicaciones, el diseño de cepas más productivas, resistentes a estrés industrial o con rutas metabólicas optimizadas. Además, implementar un protocolo estandarizado fortalece la reproductibilidad de los experimentos y promueve el aprovechamiento del recurso microbiano local, permitiendo desarrollar soluciones biotecnológicas más sostenibles y regionalmente relevantes. Así, los avances en la caracterización de su ploidía y la transformación genética de *K. marxianus* no solo enriquecen el conocimiento básico de esta levadura, sino que también construyen una plataforma experimental sólida para su futura explotación industrial.

Unión de extremos no homólogos (NHEJ)

Diversas investigaciones revelan que *K. marxianus* posee un sistema altamente eficiente de recombinación de ADN vía la unión de extremos no homólogos (NHEJ,

por sus siglas en inglés), que favorece la integración aleatoria de fragmentos de ADN no homólogos en su genoma (Ding et al., 2020). La NHEJ puede reparar la rotura del ADN en cualquier momento durante el ciclo celular y no requiere ninguna homología. Las enzimas implicadas en este proceso de reparación incluyen Ku70 y Ku80, DNA-PKcs, Artemis, polimerasa μ , polimerasa λ , XLF (también llamada Cernunnos), XRCC4 y DNA ligasa IV (Lieber et al., 2014).

El mecanismo general de NHEJ se divide en 4 etapas (Figura 9): En la primera etapa ocurre el reconocimiento del daño, las proteínas Ku70 y Ku80 se unen rápidamente a los extremos del ADN roto para protegerlos y prevenir su degradación. Luego, se lleva a cabo un reclutamiento de proteínas en las que se encuentran la DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit), que ayuda a estabilizar los extremos del ADN y coordina la reparación. Posteriormente, los extremos se procesan debido a que en ocasiones los extremos son incompatibles o tienen daños, otras enzimas como Artemis (nucleasa) los modifican para hacerlos más adecuados para la unión. Esto puede incluir recorte de bases dañadas o adición de nucleótidos. Finalmente, la ligasa IV, en asociación con XRCC4 y XLF (también conocida como Cernunnos), sella los extremos del ADN para restaurar la continuidad de la doble hélice (Davis & Chen, 2013).

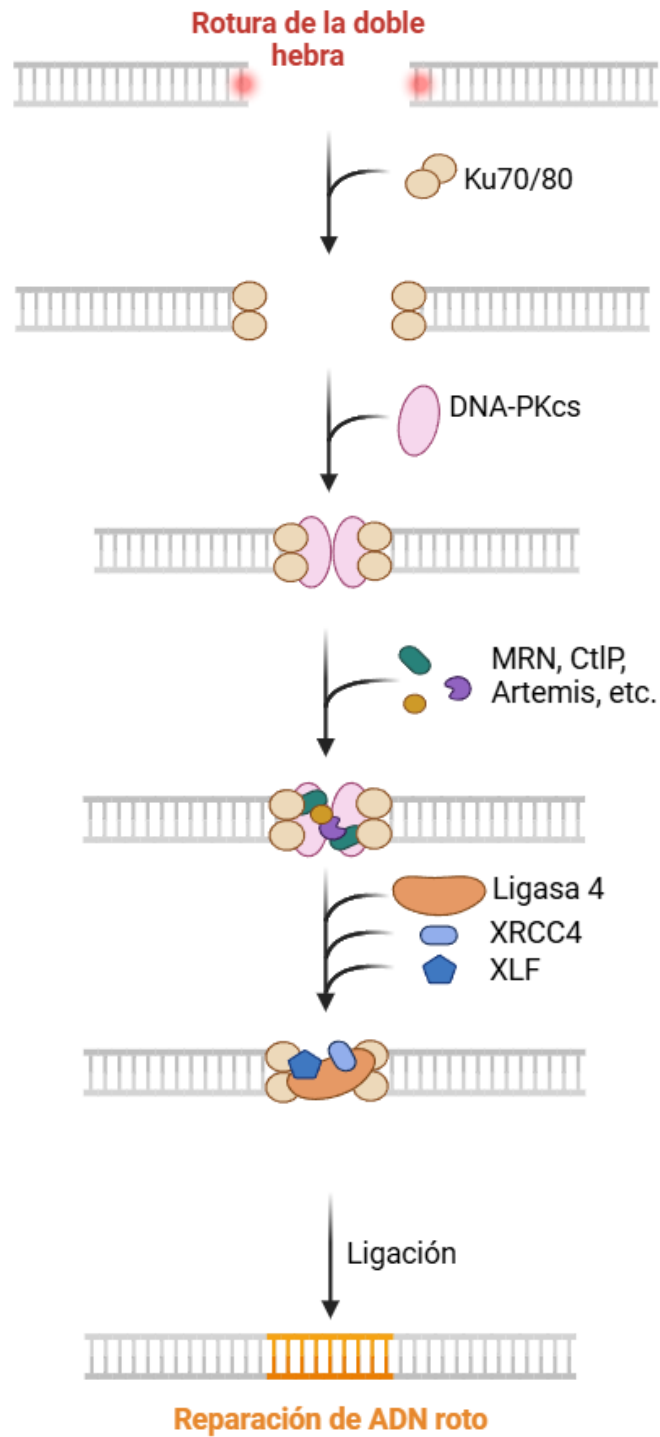


Figura 9. Mecanismo de la NHEJ obtenido de BioRender.com

Silenciamiento y aprovechamiento de la NHEJ en *K. marxianus*

Para ejecutar la correcta integración de genes en regiones homólogas en *K. marxianus* se busca controlar el mecanismo de reparación del ADN a través del silenciamiento de la NHEJ. Abdel-Banat et al.,(2010) desarrollaron un método de integración aleatoria de genes altamente eficiente con una frecuencia que excede 2.5×10^6 transformantes/ μg de ADN lineal, comparable a la transformación con plásmidos de replicación autónoma en *S. cerevisiae*. Para establecer el mecanismo de integración homóloga en la cepa *K. marxianus* DMKU3-1042, se identificó y eliminó el gen KU70 que codifica para la enzima Ku70 que forma parte del heterodímero responsable de la reparación por NHEJ en *K. marxianus*. El método de transformación utilizado fue la quimiotransformación con acetato de litio empleando un fragmento de ADN amplificado por PCR en células de *K. marxianus*. En contraste, Hoshida et al., (2014b) desarrollaron un sistema de clonación que aprovecha la eficiencia de NHEJ. Cuando un fragmento de marcador de selección truncado en el extremo C-terminal y no funcional se une con un fragmento de ADN correspondiente a la región truncada, se genera un marcador funcional. El ADN objetivo por clonar es amplificado por PCR fusionando la parte C-terminal del marcador de selección truncado. Los transformantes que contienen el marcador completo, es decir con los segmentos unidos correctamente, se pueden seleccionar mediante crecimiento en medios selectivos y, en consecuencia, el ADN objetivo se co-selecciona junto con los marcadores correctamente unidos de manera aleatoria por NHEJ (Figura 10).

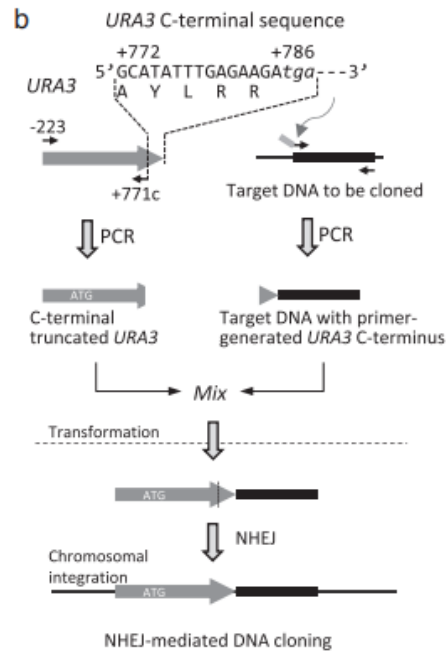


Figura 10. Sistema de selección de marcadores funcionales mediado por NHEJ en *K. marxianus* (Hoshida et al., 2014).

Se han desarrollado plásmidos circulares para *K. marxianus* (Figura 11) conteniendo diferentes marcadores de selección para ser utilizados en la clonación basada en la NHEJ y la construcción de ADN recombinante. En estos plásmidos se utilizaron las secuencias homólogas de KMARS7 (secuencia de replicación autónoma) y KMCenD (secuencia de centrómero) previamente aisladas de *K. marxianus* como elementos para permitir la replicación autónoma de estos plásmidos. Gombert et al. (2016) mencionan que el enfoque de inserción aleatoria de genes mediada por NHEJ o por transposones, no es conveniente para transformar múltiples genes en un huésped cuando se desean números de copias de genes definidos o bien para la interrupción de genes específicos, por esta razón son de utilidad los plásmidos como los descritos arriba.

También se ha implementado el diseño y adaptación de vectores integrativos como el desarrollado por Bragança et al. (2014), en el que la proteína no estructural 1 del

virus del dengue tipo 1 se integró en el genoma de *K. marxianus* UFV-3 en el *locus* LAC4 utilizando un vector integrador adaptado diseñado para la expresión de alto nivel de proteína recombinante en *K. lactis*. Con el plásmido recombinante obtenido, *K. marxianus* UFV-3 se transformó por electroporación, integrándose el ADN exógeno en su genoma.

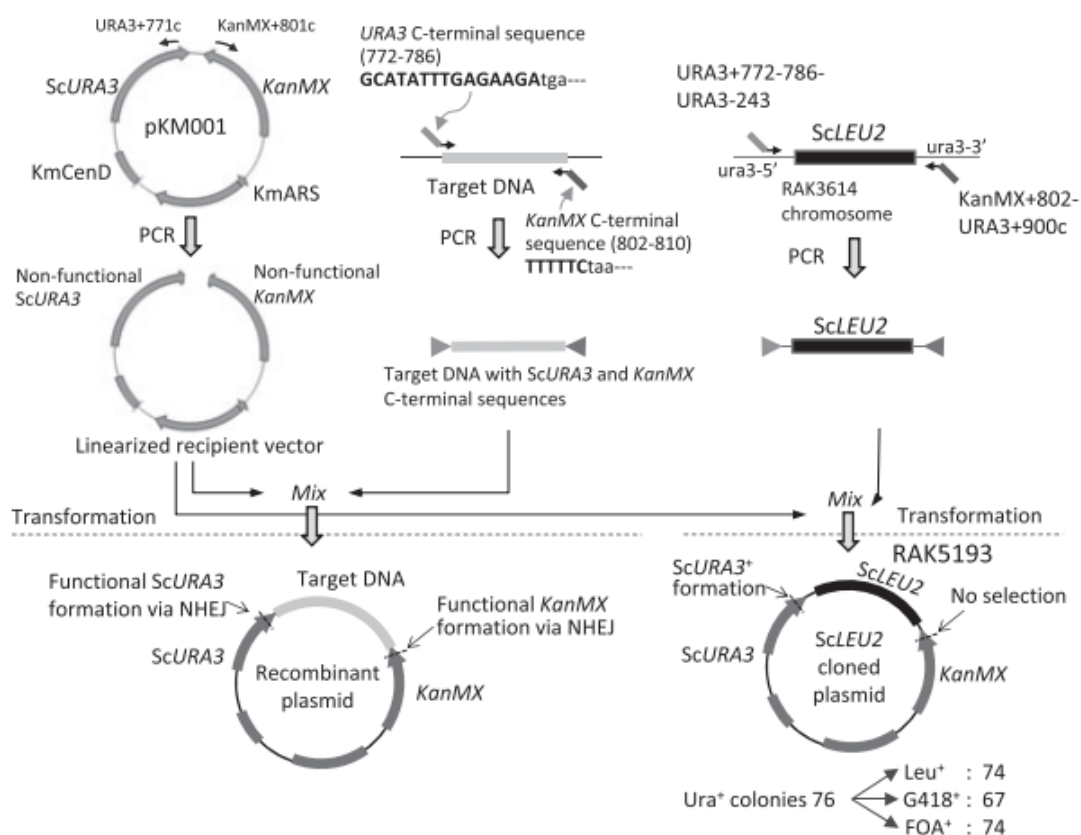


Figura 11. Clonación de ADN mediada por NHEJ en el plásmido de *K. marxianus* mediante selección de marcador funciona. (Hoshida et al., 2014b).

Capítulo III. Objetivos e hipótesis

Objetivo general

Estudiar el efecto de la temperatura en la estructura de la pared celular de cepas autóctonas de *K. marxianus* y en la eficiencia de transformación e integración de ADN exógeno en estas levaduras.

Objetivos específicos

1. Determinar la ploidía de las cepas autóctonas en *K. marxianus*.
2. Determinar la influencia de la temperatura de cultivo en el crecimiento y estructura de la pared celular de las cepas autóctonas de *K. marxianus*.
3. Proponer condiciones de temperatura de cultivo para la transformación de *K. marxianus*.
4. Identificar de genes implicados en la remodelación de la pared celular de *K. marxianus*.

Hipótesis

Las altas temperaturas de cultivo afectan la estructura de la pared celular, lo que en consecuencia aumenta la eficiencia de transformación e integración de ADN exógeno en cultivos de cepas de *K. marxianus* autóctonas.

Capítulo IV. Materiales y métodos

Mantenimiento de las cepas de estudio

Siete cepas de *K. marxianus* recuperadas de diferentes etapas del proceso de producción de pulque y mezcal de henequén fueron amablemente proporcionadas por la Dra. Patricia Ester Lappe Oliveras, estas se obtuvieron de la Colección de Cultivos Microbianos (levaduras y mohos) del Laboratorio de Micromicetos (C006) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Lappe-oliveras et al., 2023) y del Centro de investigación Científica de Yucatán (CICY). Las cepas utilizadas para este estudio se mantuvieron en ultracongelación a -80°C con glicerol 25% (v/v) como crioprotector. Los cultivos en medio sólido se realizaron por estriado en agar YPD y se incubaron a 30°C por 48 horas a partir de las cepas conservadas en ultracongelación. Los inóculos se prepararon en caldo YPD a partir de una colonia inoculada en 5 mL de medio y cultivada a 30°C con agitación orbital de 200 rpm durante 16 horas. La composición del medio YPD es 20 g glucosa L^{-1} , 10 g extracto de levaduras L^{-1} , 20 g peptona L^{-1} y para el medio sólido se agregaron 15 agar L^{-1} . En la tabla 5 se enlistan las cepas que se estudiaron.

Tabla 5. Características de cepas autóctonas de *K. marxianus*.

Cepa	Clave	Origen	Ploidía*
Kmx 11	Km3Sp	Semilla de pulque o inóculo	Indeterminada
Kmx 14	CICY-Ki/H	Base de hoja de henequén recién cortada	Haploide
Kmx 15	Km17P	Pulque fermentado (180 h)	Indeterminada
Kmx 16	EXOCI	Jugo de henequén cocido sin fermentar	Haploide
Kmx 21	EXOC ₂	Jugo de henequén cocido sin fermentar	Diploide
Kmx 22	EX ₄₈ C ₂	Jugo de henequén cocido fermentado (48 h)	Haploide
Kmx 24	ACEC8	Tallo de henequén cocido	Diploide

*La ploidía se determinó en 2019, durante la realización de mi proyecto terminal II.

Determinación de la ploidía

a) PCR del *locus* MAT

Para la determinación de la ploidía se realizó la extracción y purificación del ADN genómico de las cepas autóctonas empleando el kit *Quick-DNA*TM Fecal/Soil (Zymo Research, Irvine, CA, USA. D6010). La concentración y pureza del ADN se determinaron en un espectrofotómetro a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU).

Se efectuó una PCR de los *locus* MAT α y MAT α utilizando como plantilla el ADN genómico de cada una de las cepas. Los oligonucleótidos¹ utilizados fueron FH_MAT_for 5' GTC CGT TCG AAA CCT GGT AG 3', MAT α 1D 5' GGT TTG GCA GGA GTA CAA CTA 3' y MAT α 1D 5' TGA AAT CCA AAG CAC CAA CT 3' cuya secuencia fue amablemente compartida por el Dr. John Morrissey (University College Cork, Ireland). La PCR se llevó a cabo en un termociclador modelo 5020 *Arktik dual* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, EE. UU.).

La mezcla de reacción para PCR de los *locus* MAT α y MAT α , así como las condiciones de la reacción se enlistan en las tablas 6, 7 y 8, respectivamente. Por último, se analizaron los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa grado analítico (Promega, EE. UU., núm. V3125) 1% en *buffer* TBE (*Tris-Borate-EDTA 10X Solution*, Biotech, EE. UU., núm. A00269) 0.5X y colorante GelRed® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.; núm. SCT123) (0.3 μ L en 30 mL de gel).

¹ Todos los oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron sintetizados y suministrados por Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, EE. UU.) a través de su distribuidor en México, UniParts S.A. (Ciudad de México).

Los geles se visualizaron por exposición a luz ultravioleta en un transiluminador modelo *Gel Logic 2200* (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EE. UU.).

Tabla 6. Componentes de la reacción de PCR del locus MAT α .

Componente	Volumen (μL)
H ₂ O libre de nucleasas	10.75
HotStarTaq Master Mix 2X (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA, Núm. M0496S)	12.5
Oligonucleótido <i>forward</i> FH_MAT_for (50 μM)	0.25
Oligonucleótido <i>reverse</i> MATalpha1D (50 μM)	0.25
BSA (10 mg mL ⁻¹)	1.25
Plantilla [10 ng ADN _g 10 μL^{-1}]	Depende de concentración ng μL^{-1}
Total	25

Tabla 7. Componentes de la reacción de PCR del locus MAT α .

Componente	Volumen (μL)
H ₂ O	10.75
HotStarTaq Master Mix 2X (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA, Núm. M0496S)	12.5
Oligonucleótido <i>forward</i> FH_MAT_for (50 μM)	0.25
Oligonucleótido <i>reverse</i> MATa1D (50 μM)	0.25
BSA (10 mg mL ⁻¹)	1.25
Plantilla [10 ng ADN _g 10 μL^{-1}]	Depende de concentración ng μL^{-1}
Total	25

Tabla 8. Parámetros del termociclador para la amplificación por PCR de los genes MAT.

	Tiempo	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	15 min.	95°C
30 ciclos de		
Desnaturalización:	30 seg.	94°C
Alineación:	60 seg.	55°C
Extensión:	30 min. 30 seg.	72°C
Extensión final:	5 min	72°C

b) Análisis bioinformático del *locus* MAT

Los borradores de genomas de cinco cepas de *K. marxianus* (Kmx 14, Kmx 15, Kmx 16, Kmx 22 y Kmx 24) fueron previamente ensamblados por el Dr. Luis Lozano del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos. Para este estudio se utilizaron los resultados arrojados por el BLAST realizados por el Dr. Lozano en el que se ejecutó el alineamiento de las secuencias de los genes que forman parte del *locus* MAT de la cepa de referencia *K. marxianus* DMKU3-1042 (MAT α 1, MAT α 2, MAT α 3, MAT α 1 y MAT α 2), así como los genes SUI1, SLA2, LAA1 y YJL206C reportados por Lane et al., (2011). Estas secuencias se compararon contra los contigs de las cepas mencionadas mediante herramientas de línea de comandos.

Posteriormente, se empleó el software SnapGene (www.snapgene.com) para ubicar y representar esquemáticamente los genes del *locus* MAT de cada cepa. La ploidía de cada cepa se determinó con base en la presencia o ausencia de MAT α y/o MAT α . Finalmente, se examinó la ubicación de los oligonucleótidos FH_MAT_for 5' GTC CGT TCG AAA CCT GGT AG 3', MAT α 1D 5' GGT TTG GCA GGA GTA CAA CTA

3' y MATapIha1D 5' TGA AAT CCA AAG CAC CAA CT 3' en cada cepa con la finalidad de corroborar los resultados experimentales obtenidos por la PCR.

c) Construcción de árboles filogenéticos

Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el software MEGA11, siguiendo lo siguiente:

1. Obtención de secuencias

Estas secuencias fueron obtenidas de los borradores genómicos de las cepas autóctonas de *K. marxianus*. Los archivos se descargaron en formato FASTA para su posterior análisis.

2. Alineamiento de secuencias

Las secuencias se alinearon con la herramienta MUSCLE, disponible en MEGA11. Para ello, se abrió MEGA11 y se seleccionó la opción *Align* "Edit/Build Alignment". Posteriormente, se importaron las secuencias en formato FASTA y se ejecutó el alineamiento con los parámetros predeterminados. Finalmente, el archivo alineado se guardó en formato MEG (.meg).

3. Construcción del árbol filogenético

Para la construcción del árbol filogenético, se seleccionó la opción *Phylogeny>Construct/Test Neighbor-Joining Tree*". Se utilizó el método *Neighbor-Joining*. Se realizaron 100 réplicas de *Bootstrap* para evaluar la confiabilidad de los nodos. Una vez generado el árbol, se verificó la correcta agrupación de las cepas.

4. Edición y exportación

Finalmente el árbol se editó realizando ajustes para mejorar la visualización, incluir los nombres de las cepas y las escalas de distancia genética, y se exportó como imagen en formato “.png”.

Influencia de la temperatura de cultivo en el crecimiento y estructura de la pared celular

I. Termotolerancia en cultivo sólido

Para la determinación del rango de temperatura de crecimiento en cultivo sólido, las cepas fueron sembradas en medio YPD agar por la técnica de microgotas. Se seleccionó una colonia aislada de cada cepa y se sembró en 5 mL de caldo YPD, incubándose a 30°C durante 16 horas y agitación orbital de 200 rpm. Luego las células se recuperaron mediante centrifugación a 10,000 rpm por 2 min. Los pellets se resuspendieron en 1 mL de solución salina 0.9% (p/v), se ajustó la densidad óptica (DO_{600nm}) a 0.2. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas ($10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ y 10^{-4}) en tubos de 1.5 mL estériles. Posteriormente, se inocularon 5 μ L de cada dilución sobre cajas Petri cuadradas que contenían medio YPD agar. Las placas fueron incubadas a 30, 37, 42, 45 y 48°C durante 48 horas. Al término del periodo de incubación, se capturaron imágenes para documentar visualmente el crecimiento microbiano.

II. Tolerancia al CFW en diferentes temperaturas

Para evaluar la influencia de la temperatura en la estructura de la pared celular de las cepas *K. marxianus* se utilizó el colorante blanco de calcoflúor (CFW, *Calcofluor White* Fluorescent Brightener 28, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.; núm F3543). del cual se describió el mecanismo de acción en antecedentes Se preparó

una solución stock al 1% (p/v) pH 6. El CFW se disolvió en KOH al 0.5% (p/v) y glicerol al 83% (v/v) en un volumen total de 10 mL y se esterilizó por filtración, siguiendo el procedimiento descrito por FJ-Ram & Klis (2006). Una colonia de cada cepa de *K. marxianus* se cultivó en 5 mL de caldo YPD, se incubó durante a 30°C por 16 horas y agitación orbital de 200 rpm. Las células crecidas se recuperaron por medio de centrifugación a 10,000 rpm durante 2 minutos, se diluyeron a una DO_{600nm} de 0.2 en solución salina 0.9 % (p/v). Se realizaron diluciones seriadas (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) y se inocularon gotas de 5 μ L de cada dilución en placas YPD agar que contenía CFW a diferentes concentraciones. Se emplearon dos rangos 0, 0.05, 0.15, 0.3, 0.5 mM y 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mM) y pH 7. Las placas se incubaron a 30, 37, 42 y 45° en la oscuridad y se registró el crecimiento cada 24 h.

III. Cinéticas de crecimiento a diferentes temperaturas

Se realizaron las cinéticas de crecimiento por duplicado técnico de las cepas Kmx 11, Kmx 14, Kmx 15, Kmx 16, Kmx 21, Kmx 22, Kmx 24 y CBS 6556 en caldo YPD siguiendo el crecimiento mediante lecturas de la DO_{600nm} con el fin de determinar fases de crecimiento y la máxima tasa específica de crecimiento (μ_{max}). Los preinóculos se obtuvieron inoculando una colonia de cada cepa en 5 mL de medio YPD a 30°C y 200 rpm durante 16 horas. Posteriormente se midió la DO_{600nm} , y se inocularon matraces de 125 mL con tapa de rosca conteniendo 25 mL de caldo YPD a una DO_{600nm} inicial de 0.2. Los matraces se incubaron a temperaturas de 30, 37, 42, 45 y 48°C durante 24 horas. El crecimiento se monitoreó cada hora durante las primeras 10 horas y luego a la hora 24. Las cinéticas de crecimiento se realizaron por duplicado y las tasas máximas de crecimiento (μ_{max}) se calcularon en la fase

exponencial utilizando la ecuación de *Monod* en la fase exponencial de crecimiento. La $\mu_{\max}$ se calculó como la pendiente de la línea recta que mejor se ajusta a la gráfica semilogarítmica de la DO_{600nm} en función del tiempo.

IV. Ensayo de sensibilidad a la liticasa

El ensayo de sensibilidad de las cepas Kmx 14, Kmx 16, Kmx 21, Kmx 22 y Kmx 24 a la liticasa se realizó utilizando células en fase media exponencial. Las cepas fueron previamente incubadas a diferentes temperaturas (30, 37, 42 y 45°C) bajo agitación orbital a 200 rpm, en matraces de 125 mL con tapa de rosca, conteniendo 25 mL de caldo YPD. Las células se colectaron en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 minutos a 20°C. El pellet recuperado se lavó dos veces en 20 mL de *buffer* de fosfatos 0.1 M a pH 0.6 y se centrifugó en las mismas condiciones. La suspensión celular fue diluida a una DO_{600nm} de 0.5 en un volumen de 30 mL de tampón de fosfato en matraces Erlenmeyer de 125 mL y liticasa (Lyticase from *Arthrobacter iuteus*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU. Núm. L4025-25KU) en una concentración final de 10.22 U mL⁻¹. Los matraces se incubaron a 30°C y agitación de 200 rpm. La disminución de la DO_{600nm} fue monitoreada en intervalos de 30 minutos durante 5 horas para observar la cinética de lisis. La tasa máxima de lisis específica para un punto de tiempo dado se calculó como la pendiente de la línea recta que mejor se ajusta al gráfico semilogarítmico de la disminución del curso del tiempo de la DO_{600nm} de la suspensión celular después de la adición de liticasa como es descrito en Ribeiro et al., (2021). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con el objetivo de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de lisis y la temperatura

de cultivo. Para ello, se utilizó un nivel de significancia de 0.05 como criterio para la toma de decisiones. El análisis fue realizado mediante el paquete de análisis de datos de Excel.

Transformación de cepas de *K. marxianus*

I. Obtención de un cassette Lac4-KanMx-Lac4 a partir del plásmido pGEMT-lac4-kanMx-lac4

Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue

Se empleó un protocolo de transformación descrito por Sabido (2021), con algunas modificaciones. Para la obtención de ADN plasmídico, se utilizó la cepa XL1-Blue de *E. coli*, la cual se inoculó en 10 mL de caldo LB suplementado con tetraciclina (Trc) [15 mg mL⁻¹]. El cultivo fue incubado a 37°C y 250 rpm durante la noche. Posteriormente, se realizó el inóculo 1:100 en 50 mL de medio LB y 50 µL de Trc [15 mg mL⁻¹], y se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.5–0.7. Una vez alcanzada la DO_{600nm} de 0.5, el cultivo se colocó en hielo durante 15 minutos. Las células se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante en condiciones estériles y el pellet se resuspendió en 50 mL de agua Mili-Q estéril y fría. El lavado se repitió mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 5 min a 4 °C y posterior suspensión en 25 mL de glicerol frío al 10 % (v/v). Se realizaron dos lavados adicionales en 2 mL de glicerol frío, siguiendo las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente, el pellet se resuspendió en 250 µL de glicerol al 10 % y se dividió en alícuotas de 50 µL para su almacenamiento a -80°C.

Transformación del plásmido pGEMT-lac4-kanMx-lac4 en la cepa XL1-Blue de *E. coli*.

El plásmido pGEMT-lac4-kanMx-lac4 fue donado por la Dra. Lucilia Dominguez de la Universidad del Miño (Portugal) (Ribeiro et al., 2007). Este plásmido tiene un tamaño de 6072 pb; contiene un gen de resistencia a la ampicilina (Amp^r) y un origen de replicación (*ori*) para *E. coli* y un cassette KanMx de resistencia a la geneticina (en levaduras) y kanamicina (en bacterias) flanqueado por dos regiones *LAC4* (obtenidas por PCR a partir de *K. marxianus* cepa 6556) que es el gen de *K. marxianus* que codifica por la lactasa (enzima β -galactosidasa que hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa). Para transformar las células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue se añadieron 50 ng de ADNp al tubo que contenía las células. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación (previamente enfriada en hielo) evitando la formación de burbujas. Posteriormente se electroporó a 1,800 V con una constante de 5 mS en un electroporador Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Inmediatamente se retiró la celda y se adicionaron 950 μ L de medio SOC (0.5% extracto de levadura, 2.0% triptona, 20 mM glucosa, 10 mM $MgSO_4$, 10 mM $MgCl_2$, 2.5 mM KCl). Se transfirió el contenido de la celda a un tubo de 1.5 mL estéril y se incubó a 37°C con agitación de 250 rpm durante 1 hora. Una vez transcurrida la etapa de recuperación, se sembraron diferentes volúmenes del cultivo en placas selectivas de LB con ampicilina [100 μ g mL^{-1}] y se incubaron a 37°C por 24 h.

Extracción de ADN plasmídico

Se utilizó el kit ZymoPURE II Plasmid Midiprep (No. Catálogo D4200 & D4201). Diseñado para la purificación de más de 400 µg de ADN plasmídico de alto número de copias a partir de 15 mL de cultivo overnight de *E. coli*. Se tomó una colonia aislada de XL1-Blue/pGEM lac4-KanMx-lac4 de las placas selectivas y se inoculó en 15 mL de medio Terrific Broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.; núm. T0918) o 2x-YT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.; núm. Y2377) adicionado de carbenicilina (Cb) [50 mg mL⁻¹]. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación de 250 rpm durante 16 horas. Posteriormente cada cultivo se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto para obtener las células y el pellet se procesó siguiendo el protocolo indicado por el fabricante del kit. Por último, se midió la concentración y pureza de ADNp mediante espectrofotometría con un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA).

Linealización del plásmido pGEMT-lac4-kanMx-lac4

(O. Ribeiro et al., 2007) Para obtener el cassette de interés (Lac4-KanMx-Lac4) se siguió la metodología descrita por Ribeiro et al., (2007), con ligeras modificaciones. El ADNp fue digerido con la enzima de restricción *NotI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.; núm. R0189S) y en presencia de su *tampón* específico NEBuffer™ r3.1 (New England Biolabs; núm. B6003S). La concentración del ADNp fue cuantificada utilizando un NanoDrop 2000, se calcularon los volúmenes requeridos para realizar reacciones de digestión con un volumen total de 250 µL por tubo. Se prepararon 10 tubos para obtener aproximadamente 50 µg de cassette digerido. Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante 17 horas, y

posteriormente se llevó a cabo la inactivación enzimática a 60°C durante 20 minutos. La digestión completa se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y *buffer* TBE 0.5x. Se analizó el gel después de una hora y se observó una banda correspondiente a 2975 pb.

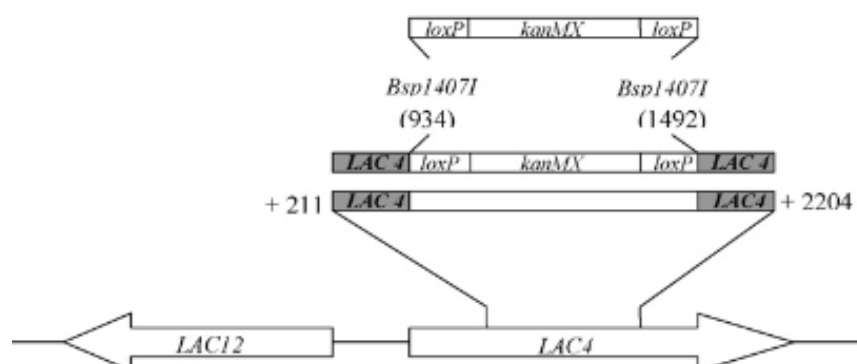


Figura 12. Representación esquemática del cassette lac4-KanMx-lac4 (Ribeiro et al., 2007).

Extracción, purificación y concentración del cassette *lac4-KanMx-lac4*

Se juntaron las digestiones de *NotI* en 4 tubos de 1.5 mL, aproximadamente 625 µL por tubo. A cada tubo se añadió un volumen igual (625 µL) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) a las digestiones. Se mezclaron vigorosamente por vórtex durante 10 segundos y se centrifugaron a temperatura ambiente por 5 minutos a máxima velocidad (13,400 rpm). Usando una pipeta de 200 µL (aproximadamente 3 pipeteadas, sin tomar nada de la interfase) se transfirió cuidadosamente la fase acuosa a tubos nuevos la fase superior, que contenía el ADNp digerido. Se midió el volumen exacto transferido con ayuda de una micropipeta de 1 mL y se añadió 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2, se mezcló por inversión 5 veces. Posteriormente se añadieron 2 volúmenes de

etanol absoluto previamente enfriado en hielo y se mezcló vigorosamente por vórtex durante 10 segundos. Finalmente, se incubó toda la noche a -70°C.

Al día siguiente se centrifugaron a máxima velocidad durante 30 min y se decantó cuidadosamente para no perder el pellet. Se añadió 1 mL de etanol al 70% previamente enfriado en hielo mezclando suavemente por inversión cinco veces. Se realizó una segunda centrifugación a máxima velocidad durante 10 min y se decantó nuevamente con cuidado para no perder los pellets. Luego de la decantación, se centrifugó por 10 segundos a máxima velocidad y se retiró por completo el etanol al 70% con ayuda de una punta amarilla sin tocar los pellets. Finalmente, el pellet se secó al vacío en un concentrador por 15 min. a temperatura ambiente y se midió la concentración en NanoDrop 2000.

II. Obtención de cassette partiendo del plásmido pUC18LAC4-KanMX

a) PCR de fragmento *lac4-KanMx-lac4*

Se llevó a cabo la amplificación por PCR del cassette *lac4-KanMx-lac4* utilizando como plantilla ADN del plásmido pUC18 *lac4-KanMx-lac4* (Figura 13). Los oligonucleótidos empleados fueron LAC4 (FW) ASR 5' CAA ACC CAT AGT AAA ATA C 3' y LAC4 (Rev) ASR 5' CCT TAT TCC TGA GAA TTT A 3'. El coctel para PCR, así como las condiciones de reacción se muestran en las tablas 9 y 10, respectivamente. Por último, se analizaron los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa 1% y buffer TBE 0.5x.

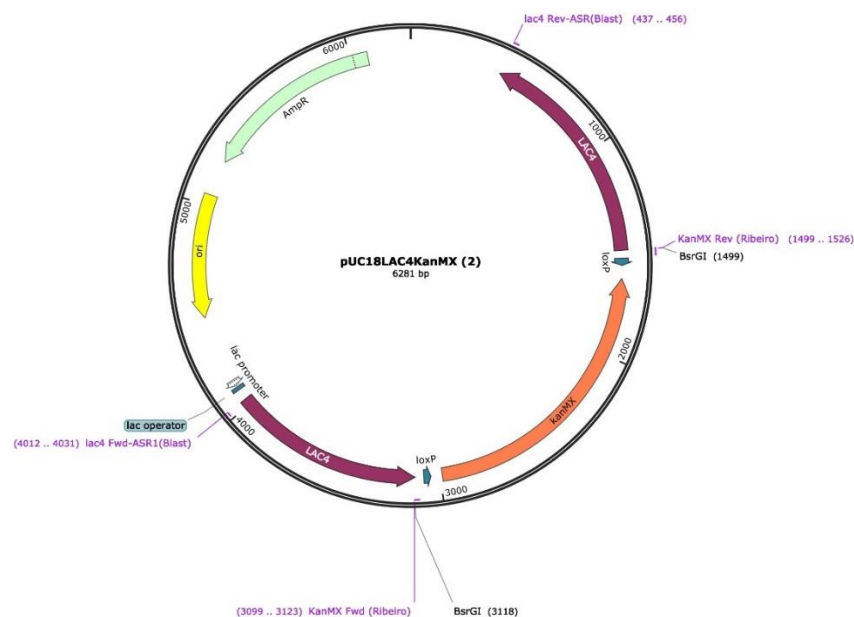


Figura 13. Plásmido pUC18LAC4KanMx (Sabido, 2021).

Tabla 9. Mezcla de reacción la para amplificación por PCR del cassette lac4-KanMX-lac4 a partir del plásmido pUC18KanMxLac4.

Componente	Volumen (μL)
H ₂ O libre de nucleasas	30
5X Phusion™ HF Buffer (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.; núm. B0518S)	10
10 mM dNTPs [200 μM]	1
Oligonucleótido <i>forward</i> LAC4 (FW) ASR [10 μM]	2.5
Oligonucleótido <i>reverse</i> LAC4 (Rev) ASR [10 μM]	2.5
DMSO [3%]	1.5
AND plasmídico [5 ng μL ⁻¹]	2
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.; núm. M0530S)	0.5

Tabla 10. Condiciones de amplificación del cassette lac4-KanMx-lac4 a partir del plásmido pUC18KanMxLac4.

	Tiempo	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	30 seg.	98°C
25 ciclos de		
Desnaturalización:	10 seg.	98°C
Alineación:	30 seg.	53°C
Extensión:	1.5 min.	72°C
Extensión final:	5 min	72°C

b) Extracción, purificación y concentración de *lac4-KanMx-lac4*

La extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania; núm. 28704), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR restantes fueron purificados directamente de la reacción mediante el QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, núm. 28104). Adicionalmente, algunos fragmentos fueron purificados y concentrados mediante el método de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v). La concentración de ADN fue determinada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

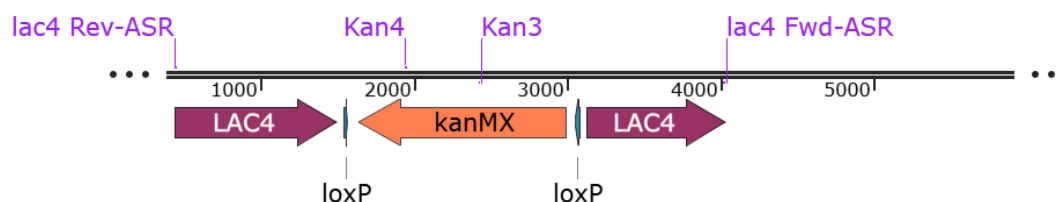


Figura 14. Cassette lac4-KanMX-lac4 a partir del plásmido pUC18KanMxLac4. Posee dos regiones de homología flanqueantes de 908 y 1067 pb respectivamente, el tamaño de kanMX es de 1.6 Kb (Sabido, 2021).

III. Preparación de células competentes y transformación de *K. marxianus*

Se describe la metodología general empleada para estandarizar un protocolo de transformación de las cepas Kmx 16, Kmx 24 y CBS 6556 de *K. marxianus*. Las variaciones entre cada prueba se centran en las temperaturas de cultivo, la composición de la mezcla de transformación, la temperatura del choque térmico, el tiempo de recuperación de las células y la concentración de antibiótico (geneticina G418) en el medio selectivo que contiene YPD agar y X-Gal 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Las cepas conservadas en ultracongelación se sembraron mediante estriado en YPD agar y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Una vez obtenidas las colonias aisladas, se seleccionaron e inocularon individualmente en tubos de vidrio con 5 mL de caldo YPD. Se incubaron a 30°C y 200 rpm durante 16 horas. Posteriormente, por duplicado se inocularon en 30 mL de caldo YPD a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.2. Para las pruebas 1 y 2, los cultivos se incubaron a 30 y 42°C (tabla 11) hasta la fase media exponencial. El cultivo de los matraces se dividió en 3 tubos Falcon de 50 mL, con aproximadamente 10 mL cada uno, se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, los pellets se resuspendieron en 1 mL de LiAc [50 mM] y se transfirió el contenido de cada uno a tubos de 1.5 mL estériles; se incubaron a temperatura ambiente (17-20°C) por 15 min. Después se centrifugó a 13,000 rpm por 30 seg. y se desechó el sobrenadante de cada tubo. Finalmente, los pellets de cada prueba se resuspendieron en una mezcla de transformación específica según se detalla en la Tabla 11. Cada mezcla se homogenizó cuidadosamente por pipeteo y se agitó en vórtex durante 15 segundos.

Tabla 11. Diferencias entre las condiciones de las pruebas de transformación de las cepas de *K. marxianus*.

Prueba	Cepa	Condiciones de cultivo	Mix de transformación	Choque térmico	Recuperación de células	Medio selectivo
1	Kmx24	30°C y 42°C 200 rpm hasta la fase media exponencial	- 40% PEG - 0.25 M LiAc - 0.02 M DTT - 25 µg ssDNA - 1 µg ADN	A) 42°C por 2 horas B) 47°C por 15 min	1 mL de YPD a 30°C por 24 h y 250 rpm	YPD X- Gal ^{40ug/mL} G418 ^{200 ug/mL}
2	Kmx24	30°C y 42°C 200 rpm hasta la fase media exponencial	- 40% PEG - 0.25 M LiAc - 0.02 M DTT - 25 µg ssDNA - 1 µg ADN	A) 42°C por 2 horas B) 47°C por 15 min	A) 1 mL de YPD a 30°C por 2.5 h y 200 rpm B) 1 mL de YPD a 30°C por 20 h y 200 rpm	YPD X- Gal ^{40ug/mL} G418 ^{200 ug/mL}
3	Kmx24	30°C y 200 rpm hasta la fase media exponencial	- 40% PEG - 0.25 M LiAc - 25 µg ssDNA (pre-tratado) - 1 µg ADN	47°C por 15 min	A) 1 mL de YPD a 30°C por 2.5 h y 200 rpm B) 1 mL de YPD a 30°C por 20 h y 200 rpm	YPD X- Gal ^{40ug/mL} G418 ^{25, 50, 100 y 200 ug/mL}
4	Kmx24	30°C y 42°C 200 rpm hasta la fase media exponencial	- 40% PEG - 0.25 M LiAc - 25 µg ssDNA (pre-tratado) - 1 µgADN	47°C por 15 min	A) 1 mL de YPD a 30°C por 2.5 h y 200 rpm B) 1 mL de YPD a 30°C 5por 20 h y 200 rpm	YPD X- Gal ^{40ug/mL} G418 ^{25 ug/mL}
5	Kmx 16 CBS 6556	30°C y 200 rpm hasta la fase media exponencial	- 40% PEG - 0.25 M LiAc - 25 µg ssDNA (pre-tratado) - 1 µg ADN	47°C por 15 min	A) 1 mL de YPD a 30°C por 2.5 h y 200 rpm B) 1 mL de YPD a 30°C por 20 h y 200 rpm	YPD X- Gal ^{40ug/mL} G418 ^{25 ug/mL}
6	CBS 6556	30°C y 200 rpm hasta la fase media exponencial	- 40% PEG - 0.25 M LiAc - 25 µg ssDNA (pre-tratado) - 12.5 µg ADN	45°C por 15 min	1 mL de YPD a 30°C por 2.5 h y 200 rpm	YPD X- Gal ^{40ug/mL} G418 ^{25 ug/mL}

Los tubos se sumergieron en baño de agua para llevar a cabo el choque térmico a 42°C por 2 horas (pruebas 1 y 2) y 47°C durante 15 min (pruebas 1, 2, 3, 4, 5 y 6).

Luego se centrifugaron a 13,000 rpm por 30 segundos, se desechó el sobrenadante

y los pellets se resuspendieron en 1 mL de YPD por pipeteo. Todos los tubos se incubaron a 30°C y con agitación orbital a 200 rpm. Después de 2.5 horas, se tomaron 150 µL de cada tubo y se sembraron en placas selectivas que contenían agar YPD adicionadas con X-Gal [40 µg/mL] y G418 en diferentes concentraciones como se indica en la tabla 11. El cultivo restante se incubó 20 horas más para sembrar las transformantes recuperadas en placas control con YPD agar y selectivas.

IV. Comprobación de integración de los cassettes *Lac4-KanMx-Lac4*

a) Aislamiento de ADN genómico por el método de fenol cloroformo

Las colonias transformadas que crecieron en medio selectivo se estiraron en placas de YPD agar suplementado con G418 [25 µg mL⁻¹] y se incubaron a 30°C por 3 días para comprobar que conservaban la resistencia a la geneticina. Luego se seleccionaron colonias aisladas candidatas y se cultivaron en 3 mL de medio YPD en tubos falcon de 15 mL con geneticina, se incubaron a 30°C con 200 rpm por 20 horas para obtener la mayor cantidad posible de biomasa. Transcurridas 20 horas, el cultivo se centrifugó a 3600 rpm a 4°C por 5 min. Cada pellet se resuspendió en 200 µL de buffer de lisis (10 mM de Tris-HCl, pH 8; 1 M de EDTA, pH 8; 100 mM de NaCl; 2% de Triton X-100; 1% de SDS), se añadieron 200 µL de perlas de vidrio (4 mm) y 400 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Los tubos se agitaron en vórtex durante 5 minutos y luego se agregaron 400 µL de *buffer* TE (10 mM de Tris-HCl, pH 8 y 1 M de EDTA, pH 8) y se mezclaron brevemente en vórtex. La mezcla se centrifugó por 10 minutos a máxima velocidad y a temperatura ambiente, se transfirieron 400 µL de la fase acuosa a un nuevo tubo de 1.5 mL y se

agregó 1 mL de etanol absoluto frío. Se mezclaron por inversión y después se centrifugaron por 5 minutos a máxima velocidad. Se realizó un lavado con etanol frío al 70% y el pellet residual se secó al vacío con temperatura ambiente en un concentrador por 15 min. Finalmente, se resuspendió en 250 μ L de *buffer* TE.

Posteriormente se realizó un paso extra para remover residuos de ARN. Se añadieron 15 μ L de RNAsa [2mg mL^{-1}], se incubó a 37°C por 30 minutos y luego se agregaron 250 μ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) a cada tubo. Se fijaron los tubos a un vórtex y se mezcló durante 5 minutos. Después se centrifugó por 5 minutos a máxima velocidad y se transfirieron 400 μ L de la fase acuosa a un nuevo tubo de 1.5 mL. Se adicionó 1 mL de etanol y 10 μ L de acetato de amonio 4 M. Se mezcló invirtiendo los tubos 6 veces. Se centrifugó por 10 minutos a máxima velocidad y se lavó el pellet con etanol frío al 70%. Nuevamente se secaron los pellets al vacío con temperatura ambiente en un concentrador por 15 minutos. Todos los pellets se resuspendieron en 100 μ L de agua MiliQ estéril. La concentración final de ADN genómico se midió en nanodrop.

b) Comprobación de la presencia de los cassettes *lac4-KanMx-lac4* en células transformantes

La verificación de la inserción genómica de los cassettes *lac4-KanMx-lac4* se llevó a cabo en dos etapas mediante PCR. En primer lugar, se procedió con la amplificación del gen KanMx que confiere resistencia al antibiótico G418, utilizando ADN genómico de las candidatas transformantes como plantilla. Los oligonucleótidos empleados fueron kan3 5' ACT GGC TGA CGG AAT TTA TGC 3' y kan4 5' AAA CTC ACC GAG GCA GTT CC 3', con un tamaño de amplicón

esperado de 500 pb. Los detalles de la mezcla para la reacción PCR de KanMx y las condiciones para la reacción se detallan en las tablas 12 y 13, respectivamente.

Tabla 12. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de KanMx.

Componente	Volumen (μL)
H ₂ O libre de nucleasas	9.5
Oligonucleótido <i>forward</i> Kan3 [50 μM]	0.25
Oligonucleótido <i>reverse</i> Kan4 [50 μM]	0.25
ADNg [10 ng mL ⁻¹]	2.5
DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.; núm. K1072)	12.5

Tabla 13. Parámetros del termociclador para la amplificación por PCR del gen KanMx.

	Tiempo	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	3 min.	95°C
30 ciclos de		
Desnaturalización:	30 seg.	95°C
Alineación:	30 seg.	55°C
Extensión:	1 min.	72°C
Extensión final:	15 min	72°C

La segunda etapa consistió en la amplificación por PCR del cassette *lac4-KanMx-lac4* utilizando ADN genómico de las candidatas transformadas, esto con el fin de identificar la correcta inserción del cassette completo en el gen LAC4 del genoma de las cepas autóctonas de *K. marxianus*. Se emplearon los oligonucleótidos LAC4 (FW) ASR 5' CAA ACC CAT AGT AAA ATA C 3' y LAC4 (Rev) ASR 5' CCT TAT TCC TGA GAA TTT A 3', con un tamaño de amplicón esperado de 3580 pb. Los cocteles para PCR de *lac4-KanMx-lac4* así como las condiciones de reacción se

muestran en las tablas 14 y 15 respectivamente. Finalmente, todos los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1.2% en buffer TBE 0.5x.

Tabla 14. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de lac4-KanMx-lac4 en candidatas transformantes.

Componente	Volumen (μL)
H ₂ O libre de nucleasas	30
5X Phusion™ HF Buffer New England Biolabs; núm. B0518S	10
10 mM dNTPs	1
LAC4 (FW) ASR [50 μM]	2.5
LAC4 (Rev) [50 μM]	2.5
ADNg [10 ng mL ⁻¹]	2
DMSO	1.5
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, núm. M0530S)	0.5

Tabla 15. Parámetros del termociclador para la amplificación por PCR del cassette lac4-KanMx-lac4 en candidatas transformantes.

	Tiempo	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	30 seg.	98°C
25 ciclos de		
Desnaturalización:	10 seg.	98°C
Alineación:	30 seg.	53°C
Extensión:	1.5 min.	72°C
Extensión final:	5 min	72°C

c) Comprobación de la identidad de las cepas por amplificación de la región ITS-5.8S

Se realizó la verificación de la identidad a nivel de especie de las candidatas transformantes mediante la amplificación de la región ITS-5.8S por PCR para comprobar que no se trataba de colonias contaminantes y garantizar que estas pertenecían a *K. marxianus*, siguiendo el protocolo de Lappe-Oliveras et al., (2023). Se utilizaron los oligonucleótidos empleados corresponden a ITS1 (Fw) 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' e ITS4 (Rev) 5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GA 3'. Los detalles de los cócteles para PCR de la región ITS y las condiciones de amplificación se muestran en las tablas 16 y 17, respectivamente. Finalmente, todos los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TBE 0.5x. Los resultados se muestran en el Anexo I.

Tabla 16. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de la región ITS5.8S de levaduras.

Componente	Volumen (μL)
H ₂ O libre de nucleasas	9.5
Oligonucleótido <i>forward</i> ITS1 [50 μM]	0.25
Oligonucleótido <i>reverse</i> ITS4 [50 μM]	0.25
ADNg [10 ng mL ⁻¹]	2.5
DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.; núm. K1072)	12.5

Tabla 17. Condiciones de amplificación de la PCR en termociclador para amplificar la región ITS.

	Tiempo	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	30 seg.	94°C
25 ciclos de		
Desnaturalización:	15 seg.	94°C
Alineación:	15 seg.	45°C
Extensión:	4.30 min.	68°C
Extensión final:	5 min	68°C

d) Análisis de microsatélites

Adicionalmente se llevó a cabo el análisis de microsatélite de las candidatas transformantes Kmx 16, Kmx 24 y CBS 6556, con el fin de compararlas a nivel cepa, de acuerdo con su perfil de bandas o huella dactilar (*finger print*) de acuerdo con la metodología de Lappe-Oliveras et al., (2023). Este análisis se realizó mediante PCR utilizando el oligonucleótido GTG₅. Los cocteles para PCR de microsatélites, así como las condiciones de reacción se enlistan en las tablas 19 y 20 respectivamente. Por último, se analizaron todos los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa 2% en buffer TBE 0.5x. Los resultados se muestran en el anexo II.

Tabla 18. Coctel reacción para la amplificación por PCR de microsatélites en candidatas transformantes.

Componente	Volumen (μL)
H ₂ O libre de nucleasas	9.5
GTG ₅	0.25
ADNg [10 ng/mL]	2.5
DreamTaq green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.; núm. K1081)	12.5

Tabla 19. Parámetros del termociclador para la amplificación por PCR del microsatélite GTG₅.

	Tiempo	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	5 min.	94°C
40 ciclos de		
Desnaturalización:	30 seg.	94°C
Alineación:	45 seg.	55°C
Extensión:	1.5 min.	72°C
Extensión final:	5 min	72°C

e) Ubicación del gen LAC4 en genomas de las cepas autóctonas

Se utilizaron las secuencias de los análisis BLAST realizados por el Dr. Luis Lozano y en ellas se alinearon de las secuencias de los genes Lac4_CHR3L (lactasa), Lac12_Chr3L y Lac12_Chr3R (lactosa permeasas) provenientes de DMKU3-1042 (Varela et al., 2019) contra los contigs de los borradores genómicos de las cepas autóctonas mediante línea de comandos. Posteriormente, se empleó el software SnapGene (www.snapgene.com) para ubicar y señalar esquemáticamente estos genes en cada cepa.

Localización de genes involucrados en la remodelación de pared celular en cepas de *K. marxianus*

Se llevó a cabo la búsqueda de las secuencias de los genes RLM1, FKS1, CHS3, CRH1, GAS1 de la cepa DMKU3-1042 de *K. marxianus*, implicados en la remodelación de la pared celular de *S. cerevisiae* (Ribeiro et al., 2021) en la base de datos NCBI. Una vez obtenidos los resultados se seleccionaron los genes pertenecientes a DMKU3-1042. Se utilizaron los BLAST realizados por el Dr. Luis Lozano en el que se ejecutó el alineamiento de las secuencias de los genes RLM1, FKS1, CHS3, CRH1, GAS1 de la cepa DMKU3-1042 contra los contigs de los borradores genómicos de las cepas autóctonas mediante línea de comandos. Posteriormente, se empleó el software SnapGene (www.snapgene.com) para ubicar y señalar esquemáticamente estos genes en cada cepa.

Capítulo V. Resultados y discusiones

I. Análisis de *locus* MAT en cepas autóctonas de *K. marxianus*

En esta primera parte, se analizó la ploidía de las cepas autóctonas de *K. marxianus*, un paso clave para comprender su biología reproductiva y evaluar su potencial en sus aplicaciones biotecnológicas. En la literatura se ha reportado que existe una relación entre el estado de ploidía y ciertas características metabólicas como la producción de compuestos volátiles (aromas) en *K. marxianus* (Adame-Soto 2023).

La amplificación de los genes MAT α y MATa por PCR con los oligonucleótidos FH_MAT_for, MATa1D y MATaplha1D generó las bandas esperadas de 3,236 pb y de 2,985 pb, respectivamente (Figura 15). Las cepas que produjeron una sola banda son cepas haploides ya sea del tipo MAT α o del tipo MATa, mientras que las cepas en las que se obtuvieron dos bandas indican la presencia de ambos *loci*, identificándose, como diploides. De las 7 cepas analizadas, Kmx 16 y Kmx 22 fueron identificadas como haploides tipo a, mientras que Kmx 14, Kmx 21 y Kmx 24 como diploides. Las cepas Kmx 11 y Kmx 15 no exhibieron la presencia de ninguna banda por lo que no se pudo determinar su ploidía (Figura 15).

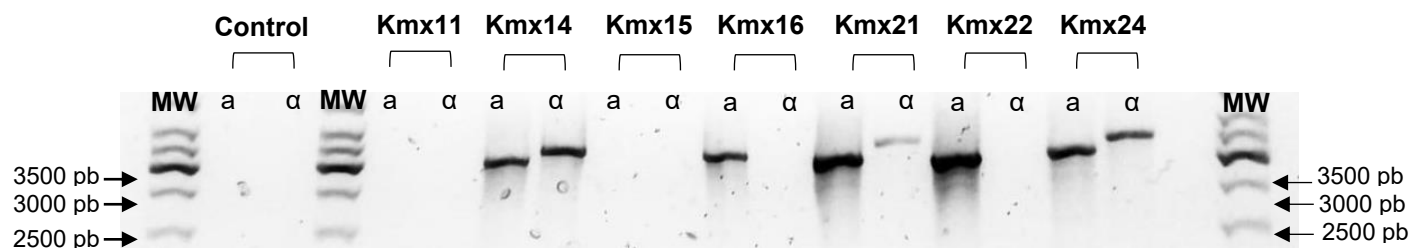


Figura 15. Gel de electroforesis de productos de PCR del *locus* MAT.

De las 7 cepas estudiadas se obtuvo el borrador genómico de 5 de ellas, Kmx 14, Kmx 15, Kmx 16, Kmx 22 y Kmx 24, a partir del cual fue posible reconstruir las regiones MAT y las regiones silenciadas HML y HMR correspondientes, así como ubicar las posiciones de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los genes MAT por PCR (Figuras 16-20). Para ello se utilizaron los genes MAT de la cepa DMKU3 1042 cuyo genoma es el de referencia para la especie *K. marxianus*, como secuencias problema (Query sequence) en un análisis BLAST para ubicar estos genes en los borradores genómicos de las cepas de estudio. El trabajo de Lane et al., (2011) con la cepa CBS608 de *K. marxianus* fue utilizado como referente para la organización esquemática de los genes del *locus* MAT. El análisis del *locus* MAT en el borrador genómico de la cepa Kmx 14 (Figura 16) confirmó la diploidía establecida por PCR utilizando los oligonucleótidos FH_MAT_for, MATa1D y MATalpha1D, al encontrarse los genes MATa1, MATa2, MATα1, MATα2 y MATα3 y genes aledaños esperados tanto en los *loci* activos como en los *loci* silenciados (en gris: SLA2, SUI1, LAA1 y YJL206C). Es importante mencionar que los oligonucleótidos utilizados sólo permiten la amplificación de los *loci* activos, pero no de los silenciados.

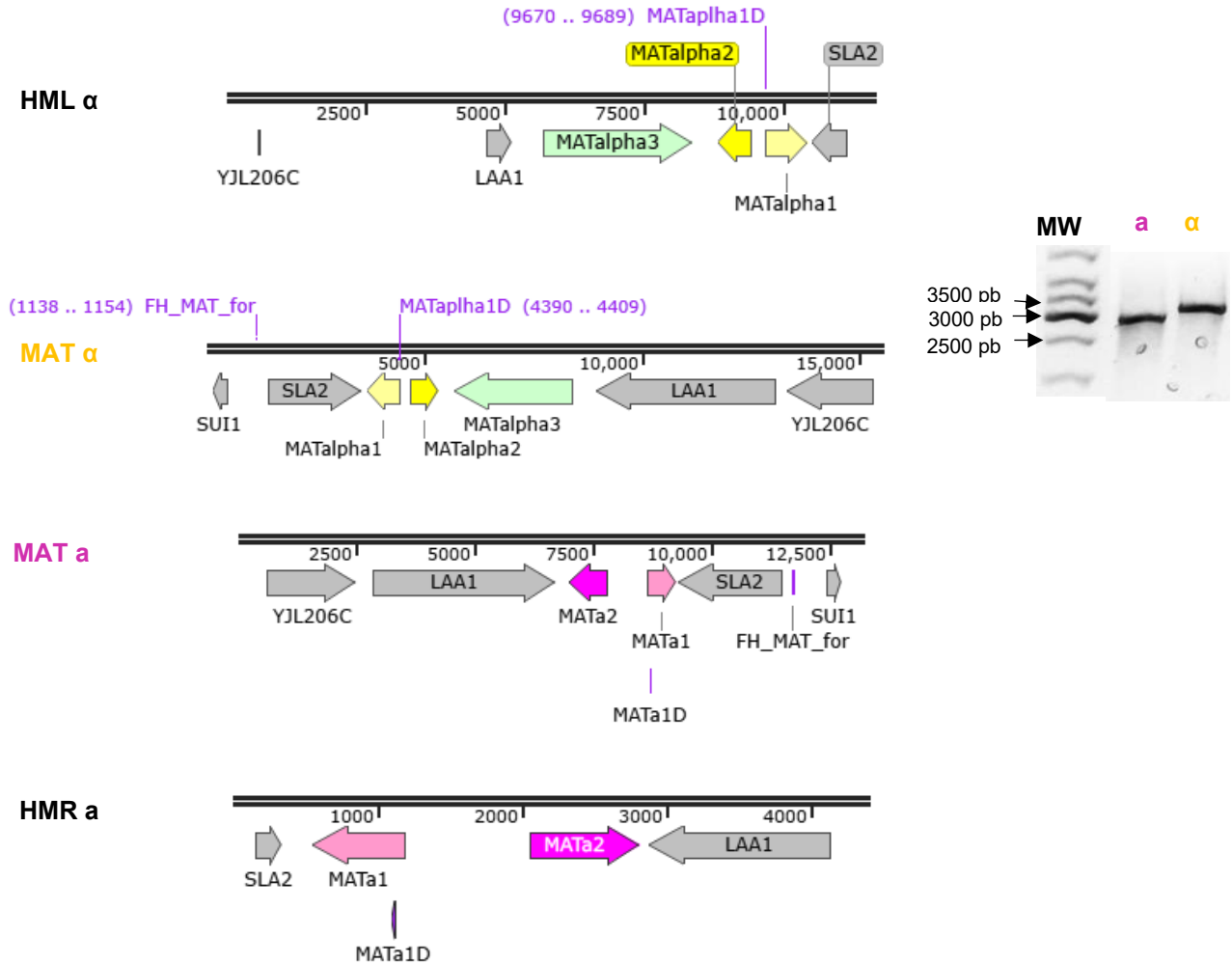


Figura 16. Localización de los genes MAT en el genoma de la cepa Kmx 14. Se muestran las regiones silenciadas HML α y HMRA así como los genes flanqueantes SUI1, SLA2, LAA1 y YJL206 en color gris. Las posiciones de los oligonucleótidos son señaladas con las etiquetas FH_MAT_for, MATalpha1D y MATa1D en color morado. A la derecha del esquema se encuentra el análisis del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa 1x. Los tamaños esperados son para MATa de 3236 pb y para MAT α 2985pb.

Respecto a la cepa Kmx 15, no se obtuvieron productos de amplificación en la PCR de los genes MAT. Sin embargo, se pudieron localizar los genes MAT α y MATa en el borrador genómico de esta cepa con la herramienta BLAST (Figura 17).

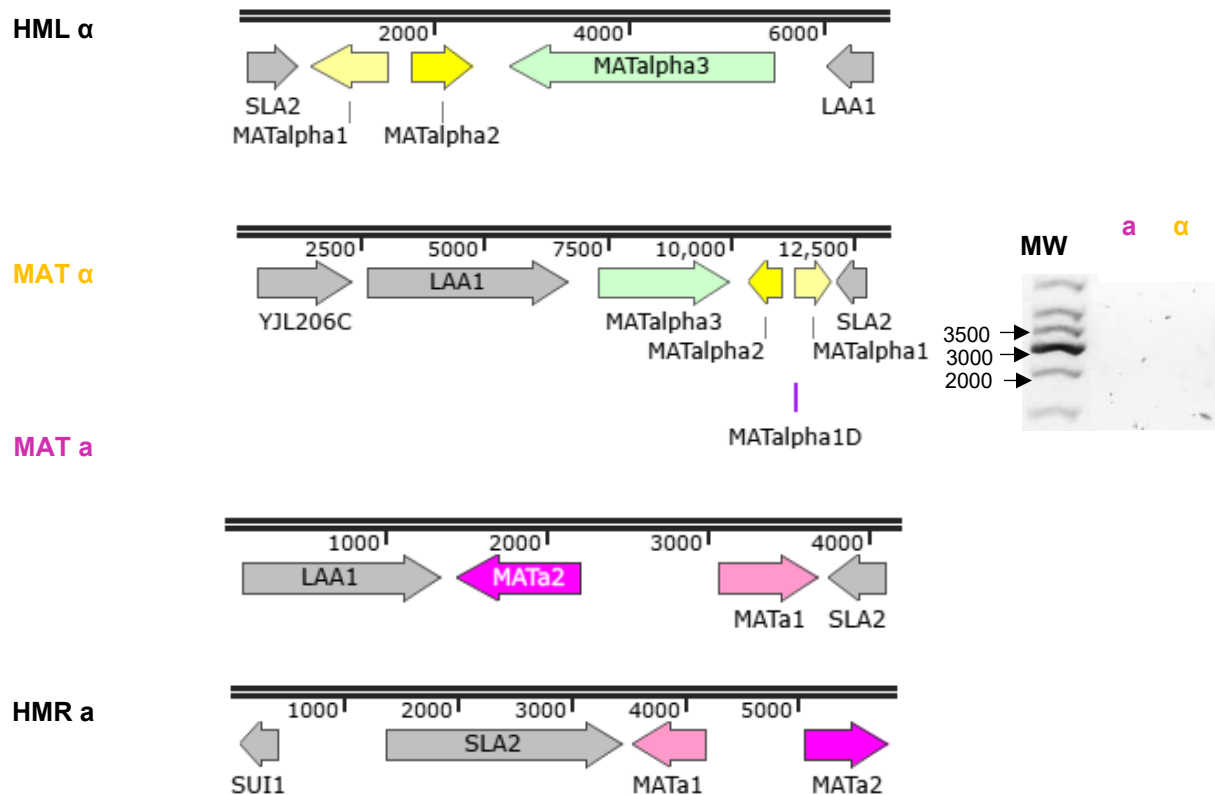


Figura 17. Localización de los genes MAT en el genoma de la cepa Kmx 15. Se muestran las regiones silenciadas HML α y HMR a así como los genes flanqueantes SUI1, SLA2, LAA1 y YJL206 en color gris. La posición del único cebador encontrado se señala con la etiqueta MATalpha1D en morado. A la derecha del esquema se encuentra el análisis del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa 1x. Los tamaños esperados son para MAT α de 3236 pb y para MAT a 2985pb.

En este caso, los porcentajes de identidad de nucleótidos fueron menores, de entre 81.8 % y 82.7 % comparado con el rango de porcentajes que va desde un 96% hasta 100% de identidad obtenido con las demás cepas (Tabla 21). Al encontrarse tanto los genes MAT a como MAT α , indicativo característico de cepas diploides, se puede inferir que esta cepa es posiblemente diploide. Sin embargo, se tendrá que verificar experimentalmente con la técnica de PCR. No se pudieron encontrar en la secuencia los oligonucleótidos FH_MAT_for, MATa1D y MATalpha1D explicando el resultado negativo de las amplificaciones de los genes MAT por PCR. Otro hallazgo importante fue la conformación diferente de los genes flanqueadores en los loci

MAT α y MATa. Esta conformación es conservada en la especie *K. marxianus* (Lane et. al., 2011). En el *locus* MAT α se observa la ausencia del gen flanqueante SUI1. El bajo % de identidad y las diferencias en las secuencias observadas en el borrador genómico podrían indicar que Kmx 15 posiblemente representa una nueva especie dentro del género *Kluyveromyces*.

En el caso de la cepa Kmx 16 se corroboró la ploidía determinada mediante amplificación por PCR del *locus* MAT que identificó esta cepa como haploide tipo a ya que su genoma sólo contiene las regiones MATa y HMRA (Figura 18).

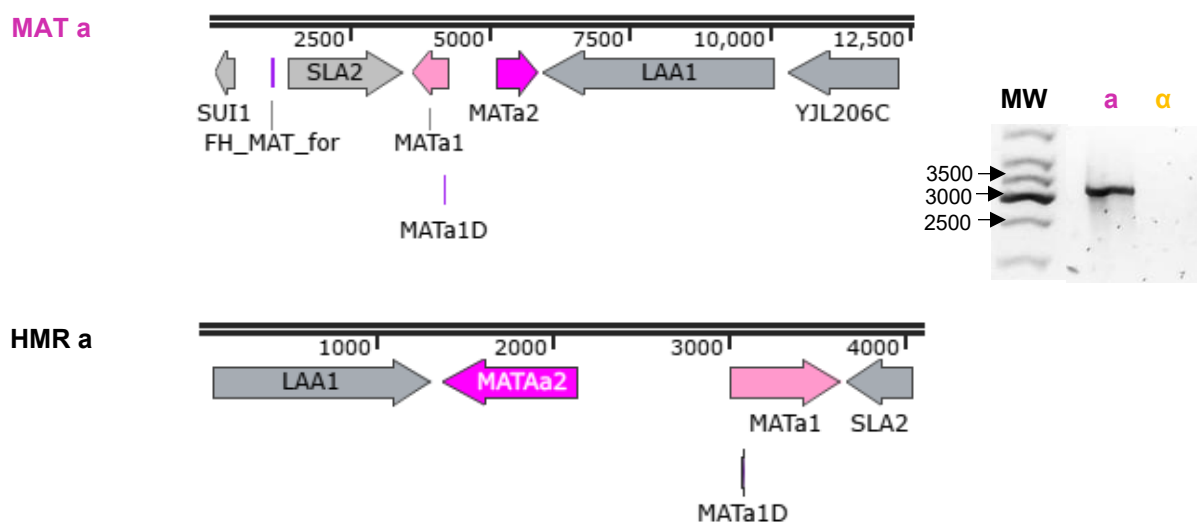


Figura 18. Localización de los genes MAT en el genoma de la cepa Kmx 16. Se muestra la región silenciada HMRA así como los genes flanqueantes SUI1, SLA2, LAA1 y YJL206C en color gris. Las posiciones de los oligonucleótidos son señaladas con las etiquetas FH_MAT_for y MATa1D en color morado. A la derecha del esquema se encuentra el análisis del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa 1x. El tamaño esperado para MATa 2985pb.

Durante el análisis del borrador genómico de la cepa Kmx 22 se identificó la presencia de los *loci* MAT α y MATa con la copia silenciada HMRA (Figura 19). Debido a que en los *loci* silenciados los genes MAT tienen diferentes secuencias aledañas, el cebador FH_MAT_for no se alinea con estos *loci* permitiendo amplificar

sólo los *loci* activos. En el caso de Kmx 22 sólo se observó la amplificación del gen MATa con la banda esperada de 2985 pb (Figura 19) indicando que esta cepa es haploide de tipo a. Se identificaron también los genes flanqueantes SUI1, SLA2, LAA1 y YJL206C.

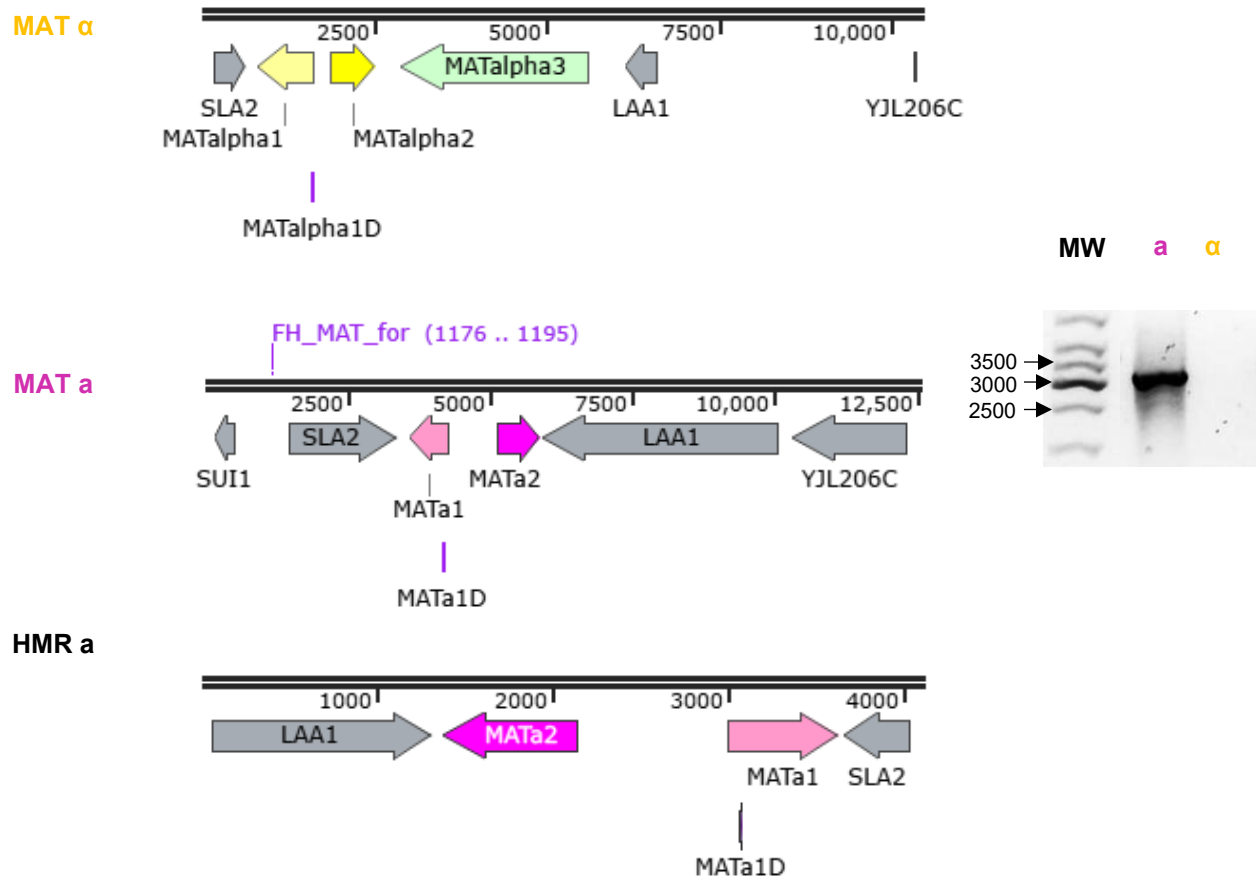


Figura 19. Localización de los genes MAT en el genoma de la cepa Kmx 22. Se muestra la región silenciada HMRa así como los genes flanqueantes SUI1, SLA2, LAA1 y YJL206 en color gris. Las posiciones de los oligonucleótidos son señaladas con las etiquetas FH_MAT_for y MATa1D. A la derecha del esquema se encuentra el análisis del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa 1x. Los tamaños esperados son para MATa de 3236 pb y para MATα 2985pb.

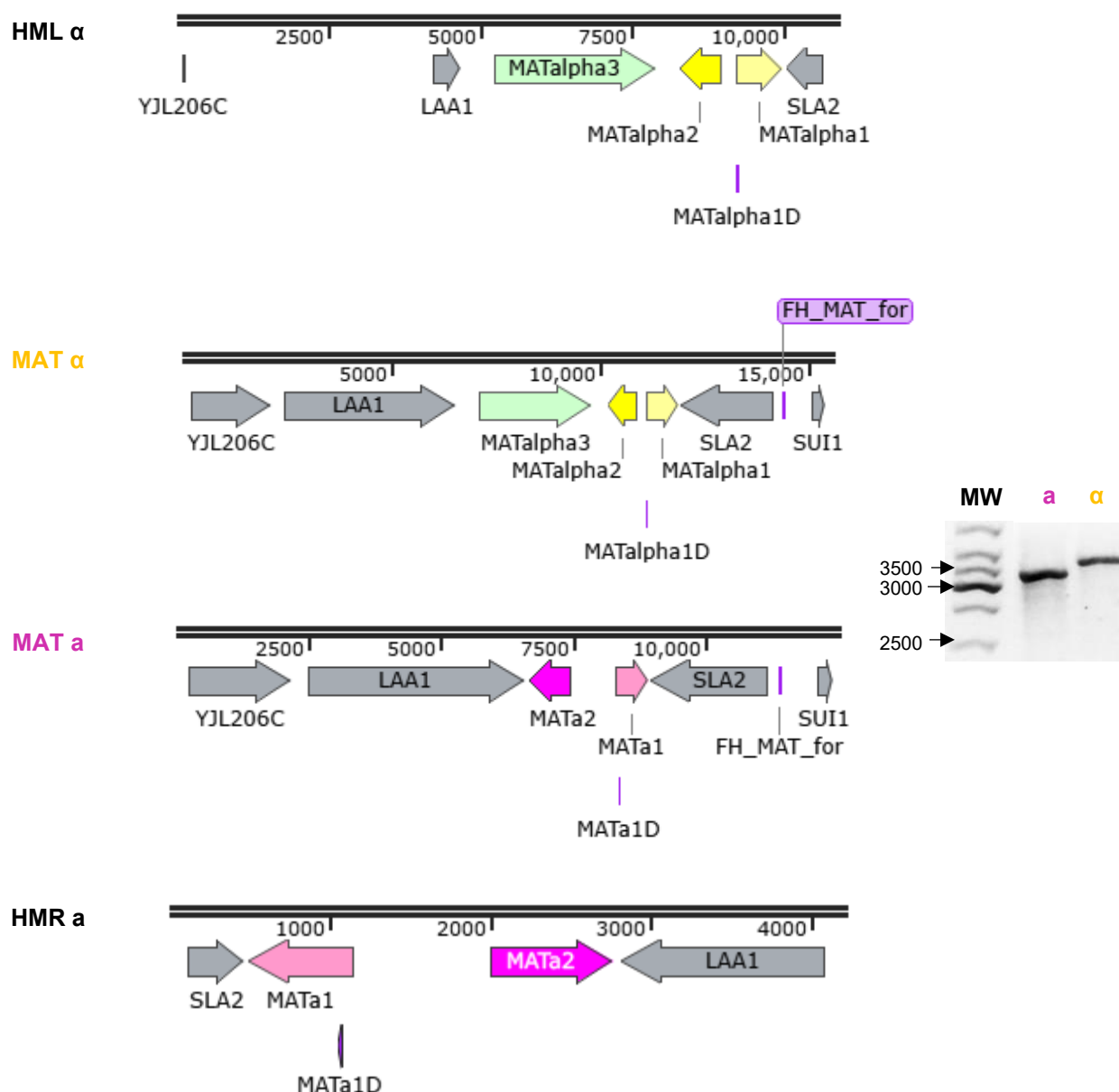


Figura 20. Localización de los genes MAT en el genoma de la cepa Kmx 24. Se muestran las regiones silenciadas HML α y HMR a así como los genes flanqueantes SUI1, SLA2, LAA1 y YJL206 en color gris. Las posiciones de los oligonucleótidos son señaladas con las etiquetas FH_MAT_for, MAT α 1D y MAT a 1D en color morado. A la derecha del esquema se encuentra el análisis del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa 1x. Los tamaños esperados son para MAT α de 3236 pb y para MAT a 2985pb.

Por último, el análisis del borrador genómico de la cepa Kmx 24 reveló la presencia de ambos *loci*, MAT α y MAT a , lo que indica una estructura diploide confirmando los resultados de PCR en los cuales aparecieron 2 bandas, una correspondiendo a MAT a y otra a MAT α . Adicionalmente, se localizaron las regiones silenciadas HML α

y HMRA, características de las cepas diploides, confirmando la presencia de ambos tipos de *loci* en el genoma de Kmx 24. Se encontraron también las secuencias de los oligonucleótidos FH_MAT_for, MATa1D y MATapha1D al igual que los genes flanqueantes característicos, SUI1, SLA2, LAA1 y YJL206C.

Debido a las similitudes fenotípicas y genotípicas observadas entre las cepas Kmx 11 y Kmx 15 (Lappe-Oliveras et al., 2023) que fueron encontradas en los mismos grupos de ITS y microsatélites, se sugiere que Kmx 11 podría ser diploide, al igual que Kmx 14, Kmx 15, Kmx 21 y Kmx 24, que mostraron la presencia de ambos *loci* MAT α y MATa.

A pesar de la similitud en la organización del *locus* MAT entre las cepas, se observa una diferencia significativa en Kmx 15 en comparación con la cepa de referencia DMKU3-1042. Esta diferencia se refleja en el porcentaje de identidad a nivel nucleótido que varía de un 81.8 % de identidad en MAT α 2 hasta un 86.8 % en MATa1. La baja homología con el *locus* MAT de *K. marxianus* sugiere diferencias significativas en las proteínas que determinan la compatibilidad reproductiva en estas levaduras. Las proteínas MAT son clave en el apareamiento, ya que regulan la identidad sexual y el reconocimiento celular entre diferentes cepas (Conde-Ferrández, 2007). Si las diferencias en las proteínas MAT de Kmx 15 son lo suficientemente grandes, esto implicaría que esta cepa no podría aparearse con otras cepas de *K. marxianus*, lo que apoya aún más la idea de que Kmx 15 representa una especie distinta. Esta falta de compatibilidad reproductiva basada en la divergencia de las proteínas MAT es un fuerte argumento para proponer que Kmx 15 se trataría de una especie reproductivamente aislada de *K. marxianus*.

(Lappe-Oliveras et al., 2023). En términos evolutivos, estas diferencias en las secuencias de aminoácidos reflejan una trayectoria evolutiva distinta, lo que sugiere una especiación en curso o completada (Ortiz-Merino et al., 2018). Así, la identificación y discusión de estas diferencias refuerza la hipótesis de que Kmx 15 no es solo una variación de *K. marxianus*, sino una entidad taxonómica propia dentro del género.

Tabla 20. Porcentajes de identidad de genes MAT de cepas autóctonas de *K. marxianus* con respecto a la cepa de referencia DMKU3-1042.

Cepas	Gen	Nucleótido	
		% Cobertura	% Identidad
Kmx 14	MATa1	100%	95.3
	MATa2	100%	96.7
	MATα1	100%	96.4
	MATα2	88%	94.8
	MATα3	100%	96.6
Kmx 15	MATa1	100%	86.8
	MATa2	100%	86.5
	MATα1	100%	83
	MATα2	96%	81.8
	MATα3	100%	82.7
Kmx 16	MATa1	100%	95.3
	MATa2	100%	96.6
Kmx 22	MATa1	100%	100
	MATa2	100%	100
	MATα1	100%	99.7
	MATα2	97%	99.7
	MATα3	99%	99.9
Kmx 24	MATa1	100%	95.5
	MATa2	100%	96.7
	MATα1	100%	96.7
	MATα2	97%	95.2
	MATα3	100%	96.6
CBS 608	MATa1	100%	98.4
	MATa2	100%	97.8
	MATα1	100%	97.4
	MATα2	100%	96.6

MAT α 3	100%	97.8
----------------	------	------

Para reforzar lo anterior, se realizaron árboles filogenéticos en los que se compararon las secuencias de nucleótidos de los genes MAT α 1 y MAT α 2. Los resultados obtenidos muestran que las cepas se agrupan en patrones similares en función de la secuencia de cada uno de estos genes, lo que sugiere la existencia de linajes genéticamente diferenciados dentro de *K. marxianus*. En particular, el análisis de MAT α 1 reveló la presencia de dos clados bien definidos, con Kmx 15 ubicándose en una posición intermedia dentro del segundo grupo, lo que indica una divergencia moderada en comparación con cepas como Kmx 16 y Kmx 22, que mostraron una relación más estrecha entre sí. El árbol filogenético del gen MAT α 2 complementó estos resultados al mostrar agrupaciones consistentes con las obtenidas en MAT α 1, lo que refuerza la hipótesis de que la variabilidad genética en los genes de apareamiento puede estar asociada con diferencias evolutivas dentro de la especie. Además, la alta confiabilidad estadística (*bootstrap* cercano a 100 en varias ramas) sugiere que las relaciones observadas reflejan diferencias genéticas bien sustentadas.

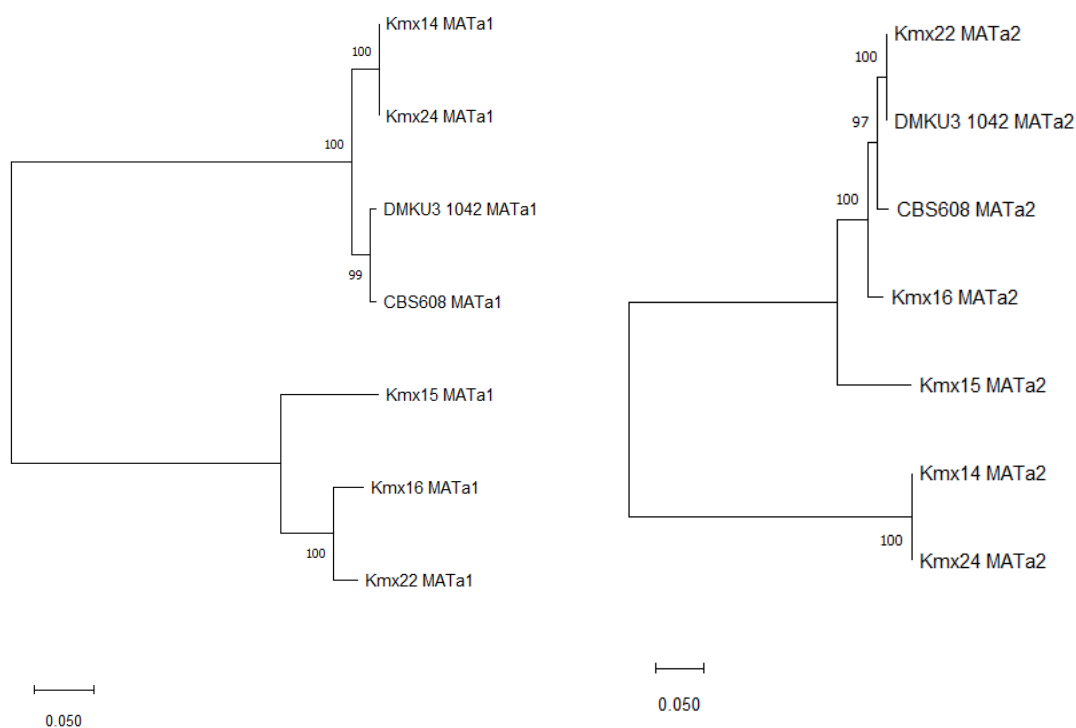


Figura 21. Árboles filogenéticos basados en las secuencias de nucleótidos de los genes MATa1 y MATa2 en cepas de *Kluyveromyces marxianus*. El análisis filogenético revela la formación de dos clados principales, con una alta confiabilidad estadística en las ramas (valores bootstrap cercanos a 100).

En la figura 22 se muestran tres árboles filogenéticos correspondientes a las variantes MATa1, MATa2 y MATa3, con el objetivo de establecer la relación evolutiva entre las diferentes cepas estudiadas. En el caso de MATa1, se observan dos clados principales: el primero agrupa a Kmx 14, Kmx 24, DMKU3-1042 y CBS 608, con un valor de bootstrap de 70, y el otro que incluye a Kmx 15 y Kmx 22, mostrando una divergencia con respecto al grupo anterior. Para MATa2, la separación entre los clados es clara y presenta valores de bootstrap de 100, lo que indica un alto nivel de confianza en la clasificación. En este caso, Kmx 15 MATa2 se agrupa junto con CBS608, diferenciándose de Kmx 14, Kmx 24 y DMKU3-1042.

En cuanto a MAT α 3, se observa una estructura similar a las anteriores, con valores de bootstrap altos (98-100), donde Kmx 15 MAT α 3 forma un clado separado junto con Kmx22, diferenciándose del grupo conformado por Kmx 14, Kmx 24, DMKU3 1042 y CBS608.

Las diferencias en la cepa Kmx15 resultan notorias en cada uno de los árboles filogenéticos analizados. En MAT α 1, Kmx15 muestra una mayor relación con Kmx22, separándose del grupo donde predominan Kmx14, Kmx24 y DMKU3 1042. En MAT α 2, la relación es más estrecha con CBS608, en contraste con el resto de las cepas, mientras que en MAT α 3, Kmx 15 se agrupa con Kmx 22, evidenciando su divergencia con el clado principal.

La divergencia observada en Kmx15 en las tres variantes de MAT α sugiere que esta cepa ha experimentado eventos evolutivos distintos en comparación con las demás. Su agrupamiento variable con CBS 608 o Kmx 22 podría indicar una relación filogenética más cercana con estas cepas en ciertos genes específicos, lo que podría estar vinculado a adaptaciones genéticas particulares o a presiones selectivas específicas en su entorno evolutivo.

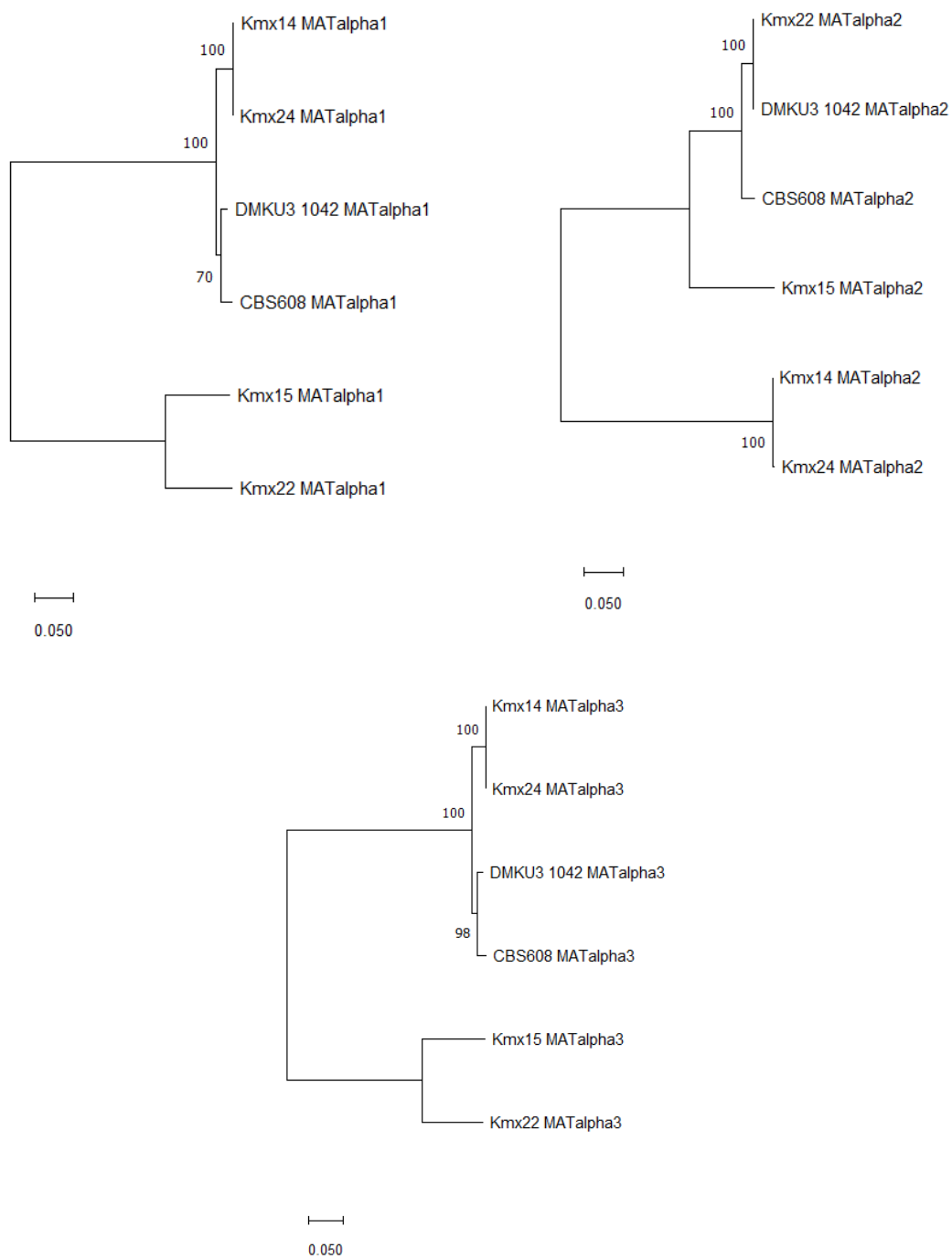


Figura 22. Árboles filogenéticos basados en las secuencias de nucleótidos de los genes MAT α 1, MAT α 2 y MAT α 3 en cepas de *Kluyveromyces marxianus*. El análisis filogenético revela la formación de dos clados principales, con una alta confiabilidad estadística en las ramas (valores bootstrap cercanos a 100).

II. Influencia de la temperatura de cultivo en la estructura de la pared celular de *K. marxianus*.

a) Evaluación de la termotolerancia en medio sólido YPD agar

Se evaluó la capacidad de crecimiento de las cepas autóctonas de *K. marxianus* (Kmx 11, Kmx 14, Kmx 15, Kmx 21, Kmx 22 y Kmx 24) a diferentes temperaturas en medio sólido. Para ello, se cultivaron en diluciones seriadas (10^0 a 10^{-4}) e incubación a 30, 37, 42, 45 y 48°C. En la figura 23 se observa que, a temperaturas de 30 y 37°C, todas las cepas mostraron un crecimiento robusto, con colonias bien definidas en todas las diluciones. Este resultado indica que dichas condiciones son más favorables para el desarrollo de *K. marxianus*. A 42°C, algunas cepas como Kmx 11 y Kmx 14, mantuvieron un crecimiento considerable, aunque en las diluciones más altas se observó una reducción en el número de colonias.

A 45°C, crecieron los aislados Kmx 14, Kmx 21 y Kmx 24 en las diluciones 10^0 a 10^4 , aunque el tamaño y densidad de las colonias disminuyó significativamente, el aislado Kmx 16 sólo creció hasta la dilución 10^3 . Es probable que la tolerancia de estas cepas esté directamente relacionada con las condiciones climáticas de su región de origen, la Península de Yucatán, caracterizada por su clima.

En contraste, a 48°C no se observó crecimiento en ninguna de las cepas evaluadas, lo que indica que esta temperatura supera el umbral de tolerancia térmica de las cepas de *K. marxianus* en medio sólido.

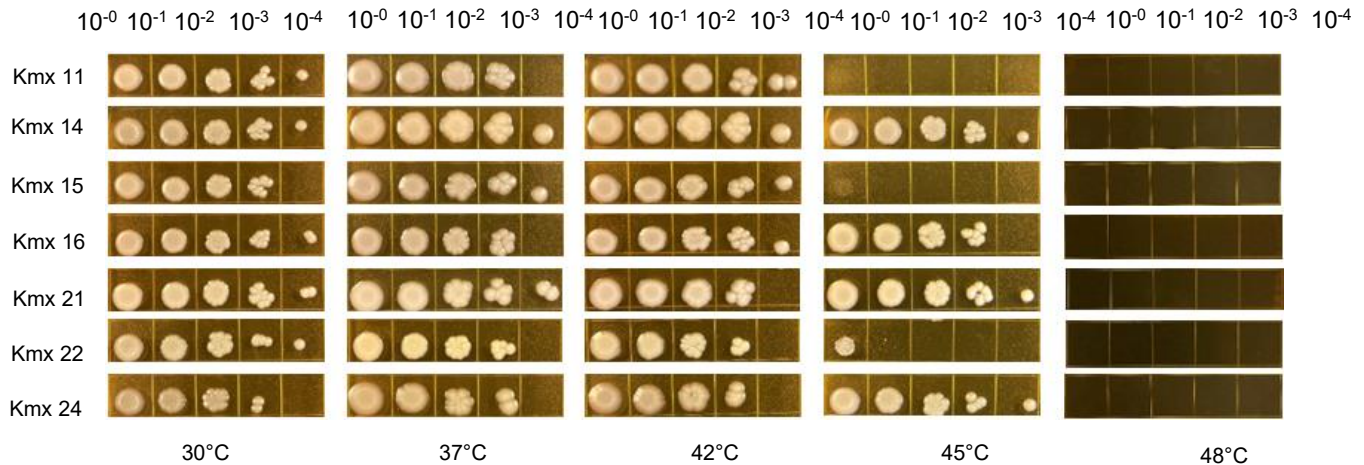


Figura 23. Tolerancia de cepas de *K. marxianus* a diferentes temperaturas. Las cepas fueron sembradas en medio sólido a 30°C, 37°C, 42°C, 45°C y 48°C en diluciones seriadas de 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴.

Asimismo, el análisis de diluciones reveló que, en concentraciones celulares elevadas (10⁰ y 10⁻¹), el crecimiento fue evidente en todo el rango de temperaturas permisivas, comprendido entre 30 a 42°C. Esto sugiere que una mayor densidad celular favorece la supervivencia y proliferación incluso en condiciones térmicas cercanas al límite superior de tolerancia. En contraste, a diluciones mayores (10⁻³ y 10⁻⁴), el crecimiento disminuyó progresivamente, siendo prácticamente nulo en temperaturas elevadas. Estos resultados indican que las cepas poseen una capacidad de crecimiento óptima entre 30 y 37°C, con algunas cepas mostrando tolerancia hasta 42°C e incluso 45°C en menor medida. No obstante, la temperatura de 48°C resultó ser letal para todas las cepas evaluadas estableciendo un rango térmico para su crecimiento en medio sólido y sugiriendo un aproximado en cultivos líquidos.

La evaluación del crecimiento de cepas a diferentes temperaturas, como 30, 37, 42 y 45°C, en medio sólido, permite caracterizar su rango térmico de tolerancia y su

potencial para aplicaciones biotecnológicas en condiciones variables. El crecimiento a 30°C es representativo de condiciones estándar de laboratorio, mientras que la capacidad de crecer a 37°C es relevante para procesos que requieren adaptación a temperaturas cercanas a la corporal, como la producción de probióticos o enzimas funcionales en el tracto gastrointestinal (Fonseca et al., 2008; Maccaferri et al., 2012). Por otro lado, el crecimiento a 42°C y especialmente a 45°C indica una termotolerancia destacada, deseable en contextos industriales donde la fermentación genera calor, o donde se busca reducir la contaminación microbiana mediante el uso de temperaturas elevadas (Lane & Morrissey, 2010; Nonklang et al., 2008). En este sentido, cepas capaces de mantener su viabilidad y crecimiento en estos rangos pueden ser consideradas candidatas robustas para la producción de bioetanol, enzimas termoestables, bioconversión de residuos agroindustriales y otros procesos en los que la eficiencia y la estabilidad térmica son factores clave (Lane et al., 2011). Además, estas propiedades facilitan su escalamiento y disminuyen los costos de enfriamiento en fermentadores, lo cual es altamente valorado en la industria biotecnológica (Cunha et al., 2020).

b) Cinéticas de crecimiento en medio líquido a diferentes temperaturas

Se realizaron cinéticas de crecimiento a 30, 37, 42, 45 y 48°C en caldo YPD por 24 h, con la finalidad de identificar la fase media exponencial y calcular la tasa de crecimiento específica máxima ($\mu_{\max}$) a diferentes temperaturas, y así determinar si la temperatura favorece su crecimiento. En estos experimentos se incluyó a la cepa CBS 6556 de *K. marxianus* como referencia, ya que es una cepa muy conocida y estudiada.

En el gráfico de la figura 24 se observa la cinética de crecimiento por duplicado de las cepas de *K. marxianus* a 30°C. Se aprecia una fase de latencia entre la hora 0 a la 3, seguida de una fase exponencial aproximada desde la hora 4 hasta aproximadamente las 8-9 horas. Posteriormente una fase estacionaria, que se prolonga de las 8-9 horas hasta las 24 horas, donde la DO_{600nm} se mantiene constante. Se observa una variabilidad entre las cepas, destacando que Kmx 11 y Kmx 15 presentan valores más altos de densidad óptica final (>20), mientras que la cepa Kmx 24 muestra un crecimiento estable pero ligeramente inferior al de las demás cepas. En el gráfico de barras de la figura 25, Kmx 11 y Kmx 15 exhiben la tasa de crecimiento más alta, de 0.55 y 0.54 h^{-1} , respectivamente, mientras que el resto de las cepas muestran una μ_{max} similar.

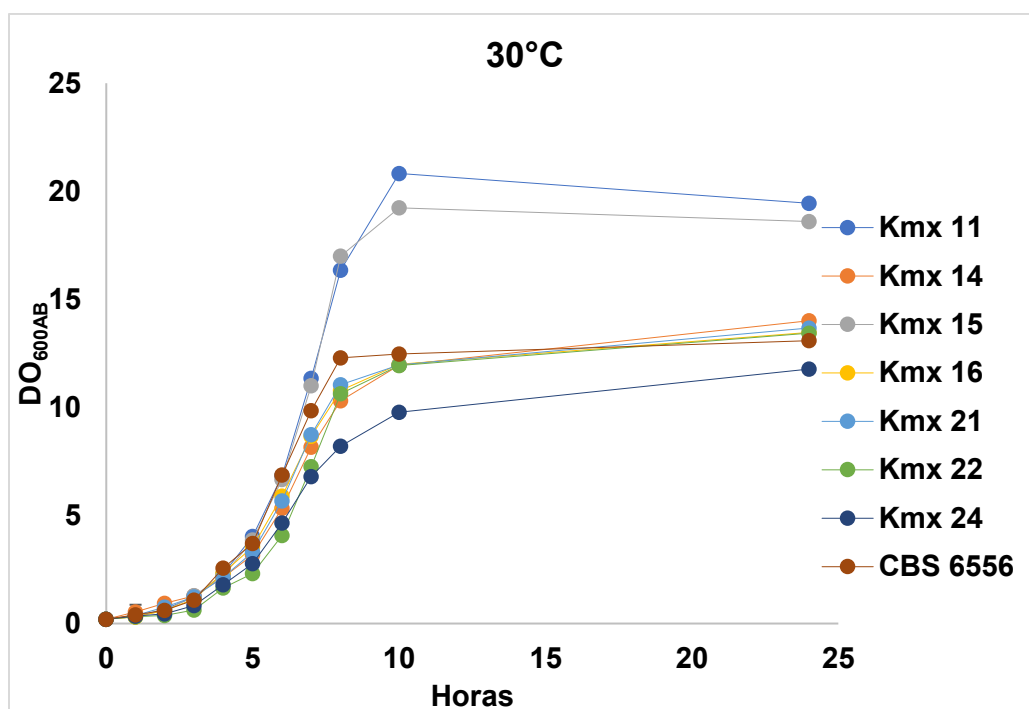


Figura 24. Cinética de crecimiento por duplicado de las cepas de *K. marxianus* a 30°C durante 24 horas. Se muestra la densidad óptica promedio a 600 nm ($D.O_{600AB}$).

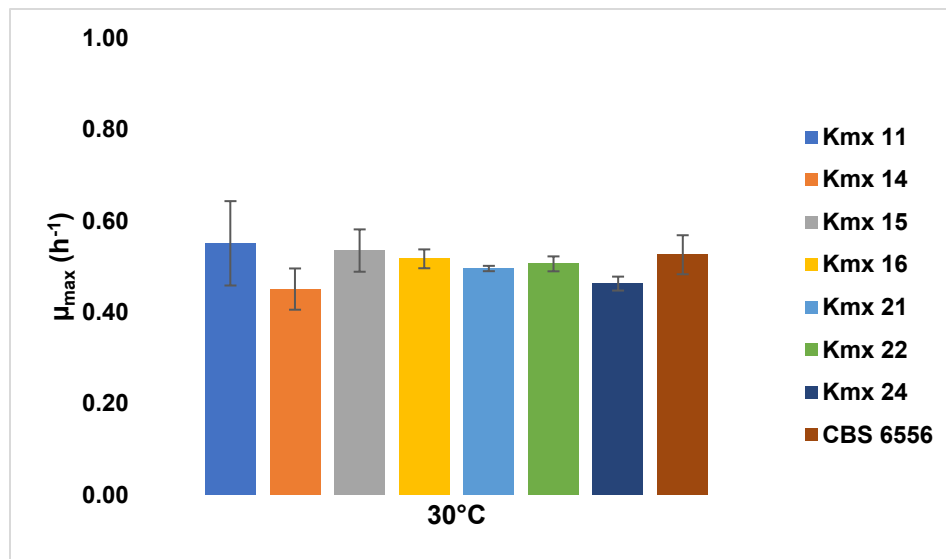


Figura 25. Tasa específica máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) en un tiempo determinado en función de la temperatura de cepas de *K. marxianus* a 30°C. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

En la figura 26 se muestra la cinética de crecimiento de todas las cepas a 37°C, por duplicado; en ella no se observa un aumento significativo en la D.O._{600nm} entre la hora 0 a la 3 (fase lag), indicando que las células están adaptándose. Nuevamente entre las horas 4 a la 9, se presenta un crecimiento exponencial en todas las cepas, con una pendiente pronunciada a la curva y la diferencia en los valores de la densidad óptica de todas las cepas en esta fase son mínimas, lo que sugiere que todas presentan una tasa de crecimiento similar (figura 27). Después de transcurridas 10 horas, la DO_{600nm} alcanza su valor máximo y se mantiene estable después de transcurridas 10 horas en todas las cepas. La temperatura de 37°C favorece un crecimiento rápido y homogéneo, lo que sugiere que esta temperatura podría ser la óptima para el crecimiento de la mayoría de las cepas evaluadas.

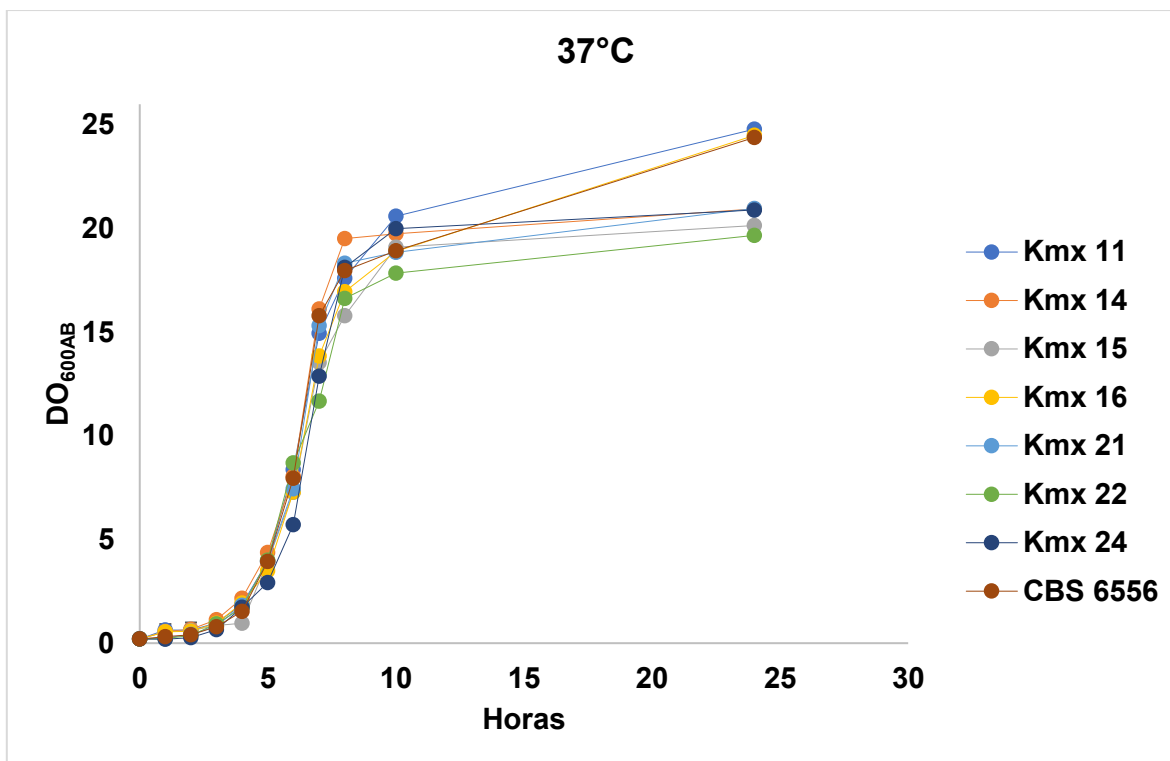


Figura 26. Cinética de crecimiento por duplicado de las cepas de *K. marxianus* a 37°C durante 24 horas. Se muestra la densidad óptica promedio a 600 nm (D.O._{600AB}).

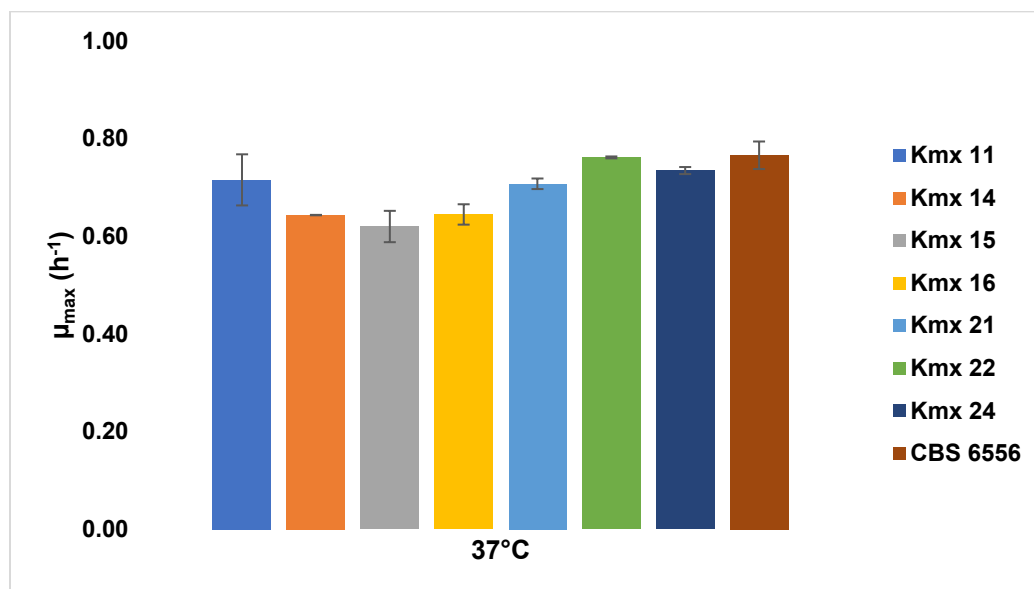


Figura 27. Tasa específica máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) de cepas de *K. marxianus* a 37°C. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

En el gráfico de la figura 27, a 37°C, se observa un aumento generalizado en la tasa máxima de crecimiento en comparación con 30°C. La mayoría de las cepas alcanzan tasas elevadas en las que aumentaron desde un 15.3% en Kmx 15 hasta un 45.5% en el caso de la cepa CBS 6556.

La gráfica de la figura 28 representa la cinética de crecimiento a 42°C, de todas las cepas, por duplicado. La fase de latencia de observa entre la hora 0 a la 3 sin aumento significativo de la DO_{600nm}. La mayoría de las cepas presentan un crecimiento exponencial acelerado, alcanzando un punto máximo entre las 6 y 8 horas aunque la pendiente de la curva es menor que la que se presenta a los 37°C. Kmx 15 exhibe un crecimiento más lento y menor densidad óptica en comparación con las demás cepas. Las cepas Kmx 14, Kmx 16, Kmx 21, Kmx 22 y CBS 6556 presentan los valores más altos de DO_{600nm} final después de 24 h. Kmx 15 muestra una disminución en la DO_{600nm} después de las 8 horas, lo que sugiere una posible sensibilidad a la temperatura.

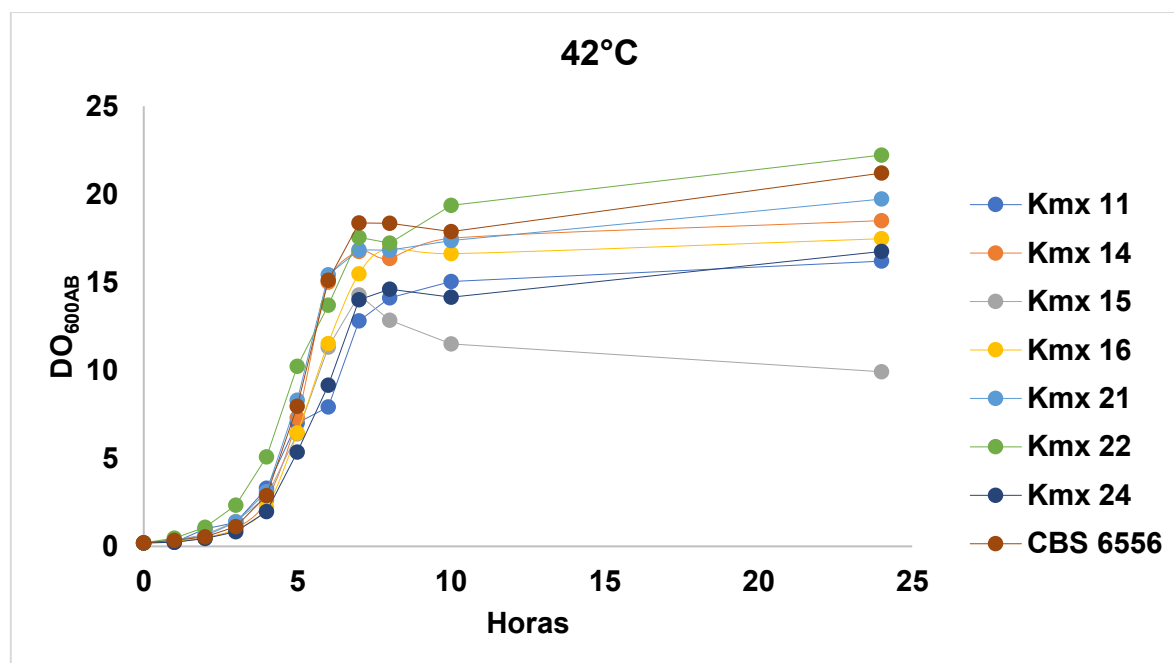


Figura 28. Cinética de crecimiento por duplicado de las cepas de *K. marxianus* a 42°C durante 24 horas. Se muestra la densidad óptica promedio a 600 nm (D.O._{600AB}).

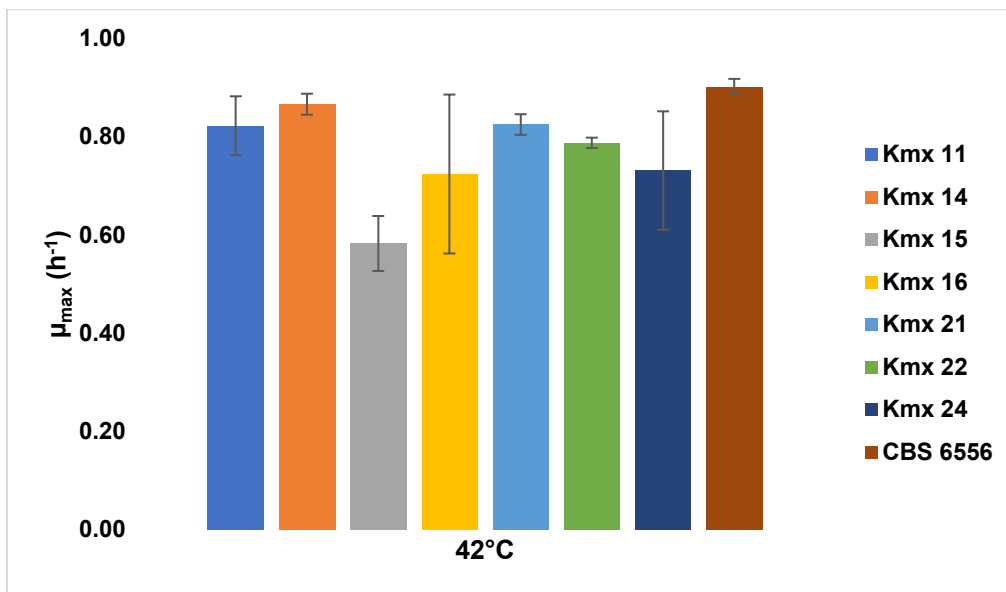


Figura 29. Tasa específica máxima de crecimiento (μ_{max}) de cepas de *K. marxianus* a 42°C. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

El análisis de las tasas de crecimiento (μ_{max}) observado en la figura 29, revela diferencias notables en la capacidad de adaptación de las cepas a temperaturas elevadas. Algunas cepas, como Kmx 14 (0.87 h⁻¹) y CBS 6556 (0.9 h⁻¹), presentan las tasas más altas, manteniendo un crecimiento considerable a esta temperatura. Por otro lado, Kmx 11 (0.82 h⁻¹) y Kmx 15 (0.58 h⁻¹) exhiben valores menores, lo que indica una menor tolerancia al calor. Aunque algunas cepas continúan mostrando un crecimiento elevado, se observa una mayor variabilidad de la μ_{max} a 37°C.

En la gráfica de la figura 30 se muestra la cinética de crecimiento de las cepas de *K. marxianus* a 45°C. Durante las primeras 3 horas, no se observó un aumento significativo en la DO_{600nm}, indicando una fase de adaptación. A esta temperatura, se presentan diferencias significativas en lo que se refiere a la fase exponencial, ya que las cepas Kmx 11 y Kmx 15 exhiben un crecimiento limitado en comparación

con el resto. En contraste, Kmx 22 y Kmx 24 muestran un crecimiento intermedio, mientras que Kmx 14, Kmx 16, Kmx 21 y CBS 6556 presentaron un crecimiento robusto, aunque menor en comparación con el observado a 37 y 42°C. Esto podría explicarse a que ambos aislados provienen de regiones tropicales en el sur de México, Kmx 14 de Yucatán y CBS 6556 de Tapachula, Chiapas.

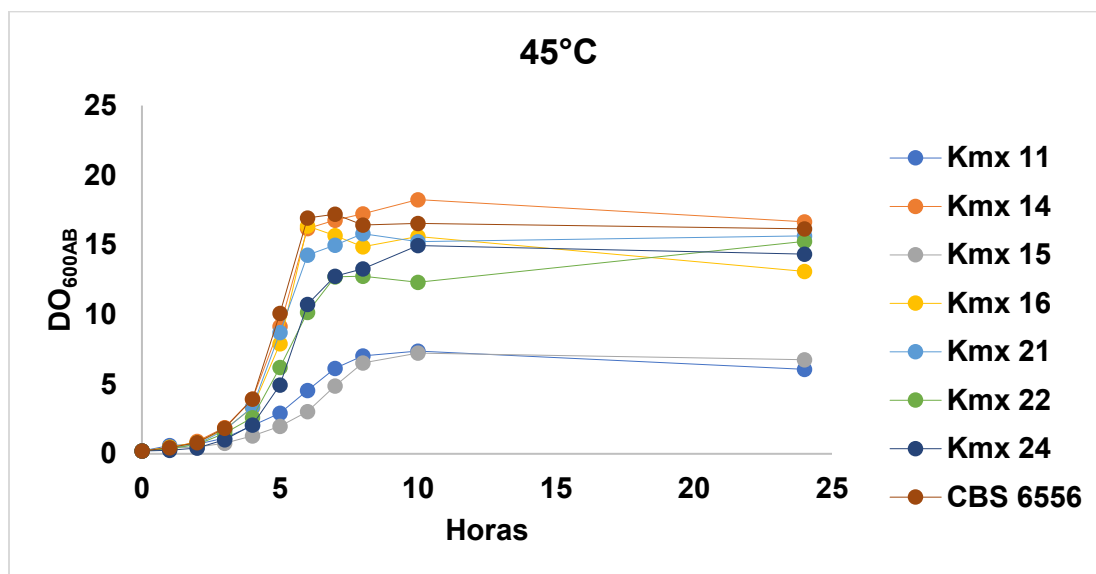


Figura 30. Cinética de crecimiento por duplicado de las cepas de *K. marxianus* a 45°C durante 24 horas. Se muestra la densidad óptica (DO_{600AB}) promedio.

Las tasas de crecimiento máximas confirman esta tendencia. Se observa una disminución en μ_{max} en varias cepas en comparación con 42°C, lo que indica una menor tolerancia a esta temperatura. Sin embargo, Kmx 24 y CBS 6556 presentaron valores elevados de μ_{max} (0.80 h^{-1} y 0.79 h^{-1}), sugiriendo una mayor tolerancia al calor. En cambio, Kmx 11 y Kmx 15 presentan tasas significativamente menores de 0.41 h^{-1} y 0.45 h^{-1} (50.03% y 22.30%, en comparación con las tasas obtenidas a 42°C) lo que confirma que su crecimiento se ve afectado por el aumento de temperatura.

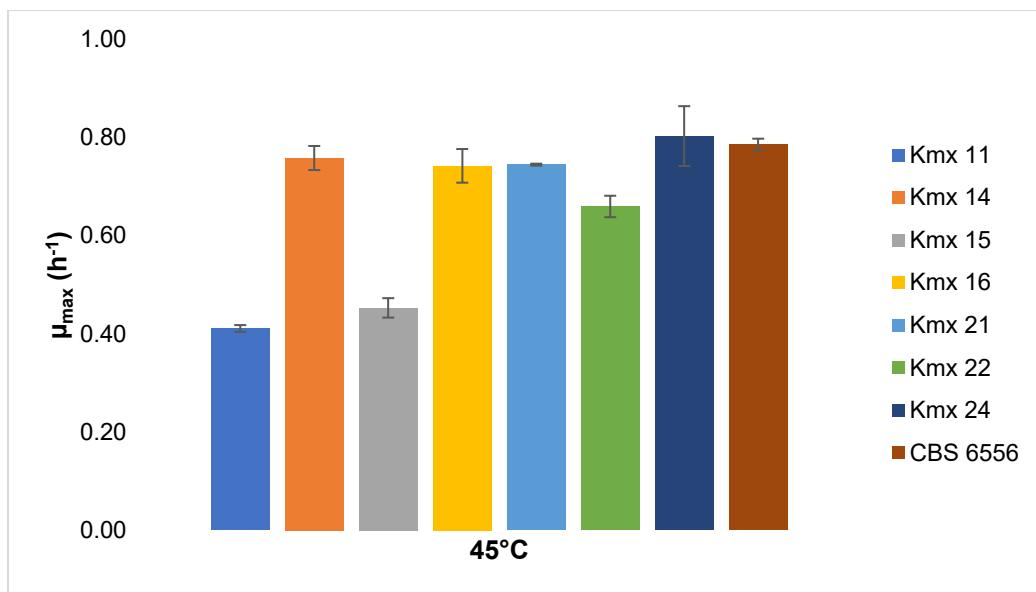


Figura 31. Tasa específica máxima de crecimiento (μ_{max}) de cepas de *K. marxianus* a 45°C. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

La densidad óptica y la disminución en la μ_{max} de Kmx 11 y Kmx 15 a 45°C es consistente con su nula tolerancia térmica en medio sólido. Sin embargo, para el resto de las cepas también es evidente la sensibilidad al calor. Esta baja tolerancia a la temperatura también puede estar relacionada con el sitio origen de los aislados, ya que ambas provienen del Estado de Hidalgo, localizado al centro de México.

En la gráfica de la figura 32 muestra la cinética por duplicado a 48°C, se observa que en las primeras horas (0-5 horas), todas las cepas presentan una fase de adaptación sin un incremento significativo en la DO_{600nm} . Las cepas CBS 6556, Kmx 14 y Kmx 24 alcanzan los valores más altos de DO_{600nm} , indicando una mayor tolerancia a 48°C. En cambio, Kmx 11 y Kmx 15 no muestran crecimiento apreciable, lo que sugiere que estas cepas no son capaces de proliferar a esta temperatura. Kmx 16 y Kmx 22 exhiben un crecimiento intermedio, aunque con valores de DO_{600nm} inferiores a los observados en temperaturas menores como 37

y 42°C e incluso 45°C. Estos resultados indican que 48°C representa un límite crítico de temperatura para la mayoría de las cepas, con una notable reducción en el crecimiento en comparación con temperaturas más bajas.

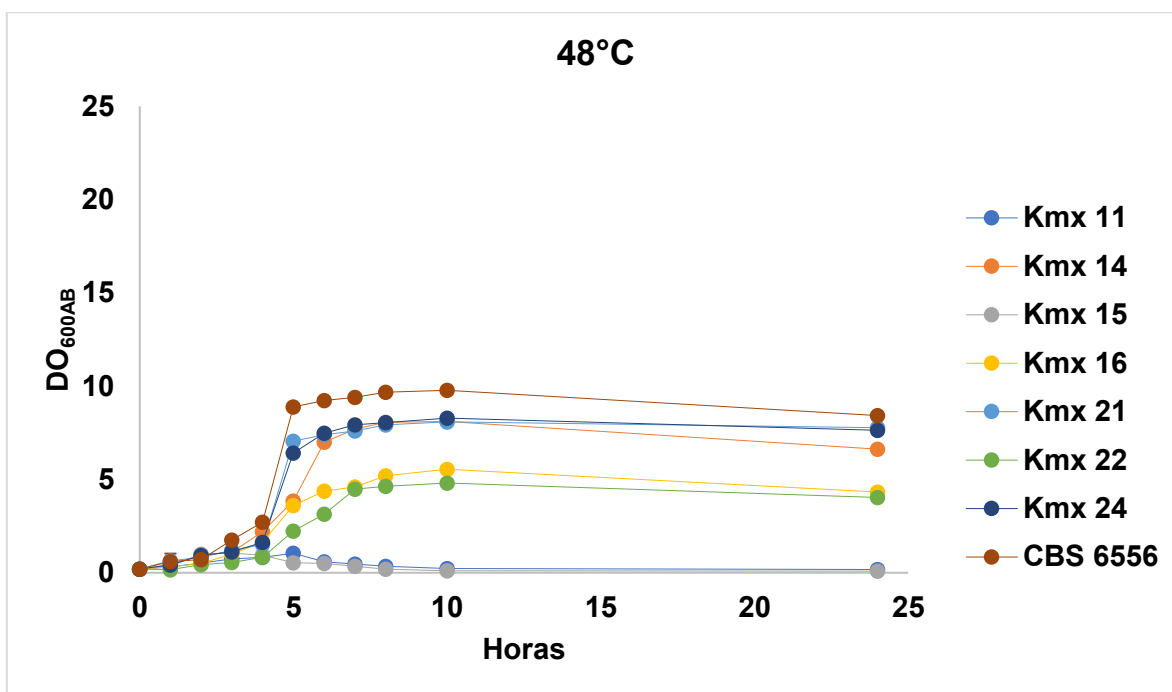


Figura 32. Cinética de crecimiento por duplicado de las cepas de *K. marxianus* a 48°C durante 24 horas. Se muestra la densidad óptica promedio a 600 nm (D.O._{600AB}).

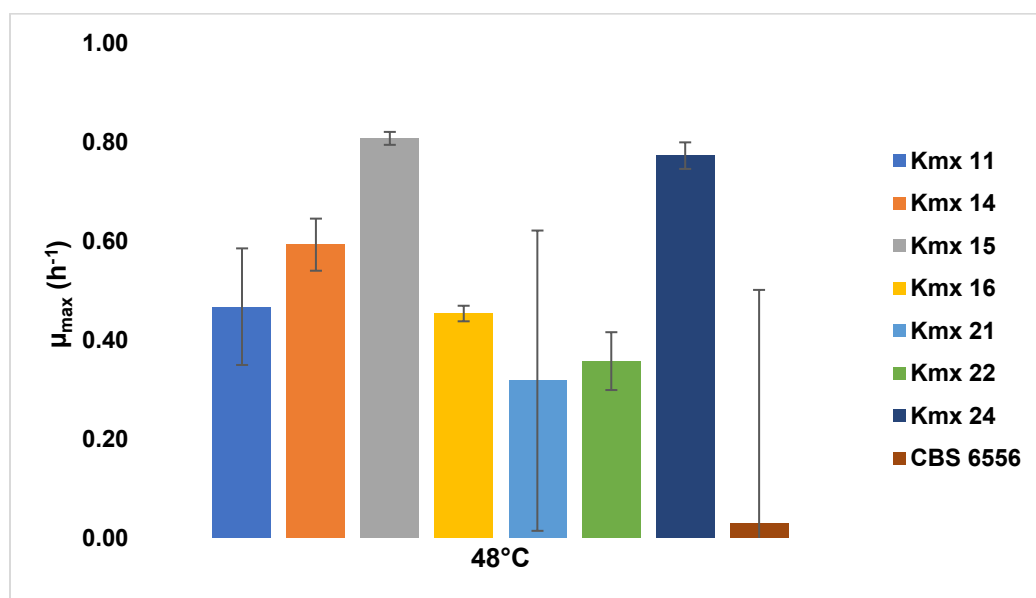


Figura 33. Tasa específica máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) de cepas de *K. marxianus* a 48°C. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

Por otro lado, las tasas de crecimiento máximas a 48°C (Figura 33) presentan una mayor variabilidad en comparación con las demás temperaturas. Asimismo, se aprecia una elevada desviación estándar en algunas de las barras que van desde un 1% hasta un 47%. Esto podría deberse a que mientras algunas células continúan en adaptación a la temperatura, algunas otras sufren daño celular, lisis o incluso la muerte, provocando una alta dispersión en los valores obtenidos. Debido a la alta variabilidad (>20%) se descartaron los valores obtenidos en la cinética de crecimiento a 48°C de las cepas de *K. marxianus*.

Los valores de las tasas específicas de crecimiento (μ_{max}) de todas las cepas a diferentes temperaturas se presentan en la tabla 21. En general, la menor tasa de crecimiento se registró a 30°C para la mayoría de las cepas, con excepción de Kmx 11 y Kmx 15, las cuales mostraron su μ_{max} más baja a 45°C, en concordancia con su reducida tolerancia térmica. Por otro lado, las cepas Kmx 11, Kmx 14, Kmx 21, Kmx 22 y CBS 6556 alcanzaron su mayor μ_{max} a 42°C mientras que Kmx 15 exhibió su tasa máxima a 37°C. En contraste Kmx 16 y Kmx 24 lograron su mayor μ_{max} a 45°C, lo que sugiere una mayor capacidad de adaptación a temperaturas elevadas.

Tabla 21. Tasa específica máxima de crecimiento de las cepas de *K. marxianus* a diferentes temperaturas (h^{-1}). Se subraya el valor más alto de μ_{max} con dos líneas (en rojo) y el valor más bajo con una (azul).

T (°C)	Kmx 11	Kmx 14	Kmx 15	Kmx 16	Kmx 21	Kmx 22	Kmx 24	CBS 6556
30	0.55 ± 0.09	<u>0.45</u> ± 0.05	0.54 ± 0.05	<u>0.52</u> ± 0.02	<u>0.50</u> ± 0.01	<u>0.51</u> ± 0.02	<u>0.46</u> ± 0.01	<u>0.53</u> ± 0.04
37	0.72 ± 0.05	0.64 ± 0.00	<u>0.62</u> ± 0.03	0.64 ± 0.02	0.71 ± 0.01	0.76 ± 0.00	0.73 ± 0.00	0.77 ± 0.03
42	<u>0.82</u> ± 0.06	<u>0.87</u> ± 0.02	0.59 ± 0.06	0.72 ± 0.16	<u>0.82</u> ± 0.02	<u>0.79</u> ± 0.01	0.73 ± 0.12	<u>0.90</u> ± 0.02
45	<u>0.41</u> ± 0.01	0.76 ± 0.02	<u>0.45</u> ± 0.02	<u>0.74</u> ± 0.03	0.74 ± 0.00	0.66 ± 0.02	<u>0.80</u> ± 0.06	0.79 ± 0.01
48	0.47 ± 0.12	0.59 ± 0.05	0.81 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.31 ± 0.30	0.36 ± 0.06	0.77 ± 0.03	0.03 ± 0.47

Esta tolerancia térmica podría estar relacionada con varios mecanismos fisiológicos, como la producción eficiente de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, “HSPs”) que estabilizan otras proteínas y protegen la célula del daño por desnaturalización (Verghese et al., 2012), así como una fluidez de membrana ajustada gracias a la modificación en la composición de ácidos grasos, que permite mantener la integridad de la membrana plasmática en condiciones de estrés térmico por altas temperaturas (Zhao & Bai, 2009). Además, cepas termotolerantes suelen presentar sistemas antioxidantes más activos, capaces de mitigar el daño oxidativo inducido por el calor, como es el caso de *K. marxianus* (Saini et al., 2018).

Desde una perspectiva biotecnológica, estas características convierten a las cepas Kmx 16 y Kmx 24 en candidatas promisorias para procesos industriales que requieren fermentaciones a temperaturas elevadas, como la producción de bioetanol. El uso de cepas termotolerantes reduce el riesgo de contaminación microbiana, permite el uso de residuos lignocelulósicos que generan calor durante su hidrólisis y disminuye los costos energéticos asociados al enfriamiento del biorreactor (Saini et al., 2018). Estas ventajas refuerzan la importancia de identificar y aprovechar cepas autóctonas con rasgos fisiológicos adaptados al calor.

c) Tolerancia al blanco de calcoflúor CFW a diferentes temperaturas

Con la finalidad de evaluar la respuesta de la pared celular a la temperatura se realizó un ensayo de susceptibilidad a blanco de calcoflúor (CFW por sus siglas en inglés). El CFW se ha empleado para evaluar la cantidad de quitina en las paredes celulares de levaduras. Al unirse a la quitina, este colorante altera el ensamblaje de la pared celular por lo que las células con un alto contenido de quitina retienen más

CFW, lo que resulta en una menor tolerancia a este colorante (Lappe-Oliveras et al., 2023). Para evaluar este efecto, primero se determinó la concentración máxima de CFW a la cual se inhibió por completo el crecimiento de las cepas de *K. marxianus*. En la figura 34 se muestra la susceptibilidad de las cepas Kmx 11, Kmx 14, Kmx 15, Kmx 16, Kmx 21, Kmx 22 y Kmx 24 a concentraciones diferentes de CFW (0 mM control, 0.05, 0.15, 0.3, 0.4 y 0.5 mM), en un rango de temperaturas de incubación (30, 37, 42 y 45°C). En la condición A de control (0 mM), todas las cepas presentaron lo que coincide con lo observado en la prueba de termotolerancia en cultivo sólido. A medida que la concentración de CFW aumentó (B-F), el crecimiento se redujo progresivamente, lo que indica que el CFW tiene un efecto inhibitorio en la mayoría de las cepas. No obstante, Kmx 11 y Kmx 14, mostraron mayor resistencia al CFW en concentraciones bajas (B, C) pero su crecimiento disminuyó significativamente en concentraciones más altas (D-F). A 37°C se observa un patrón similar al de 30°C, con crecimiento abundante en el control en el control (A) y disminución progresiva con el aumento de la concentración (10^{-3}) de CFW. En las temperaturas de 42 y 45°C se observó un crecimiento muy limitado o nulo en todas las condiciones, por lo que la concentración máxima inhibitoria de CFW se encontró por debajo de C (0.15 mM) para la mayoría de las cepas, las diluciones y en todas las temperaturas.

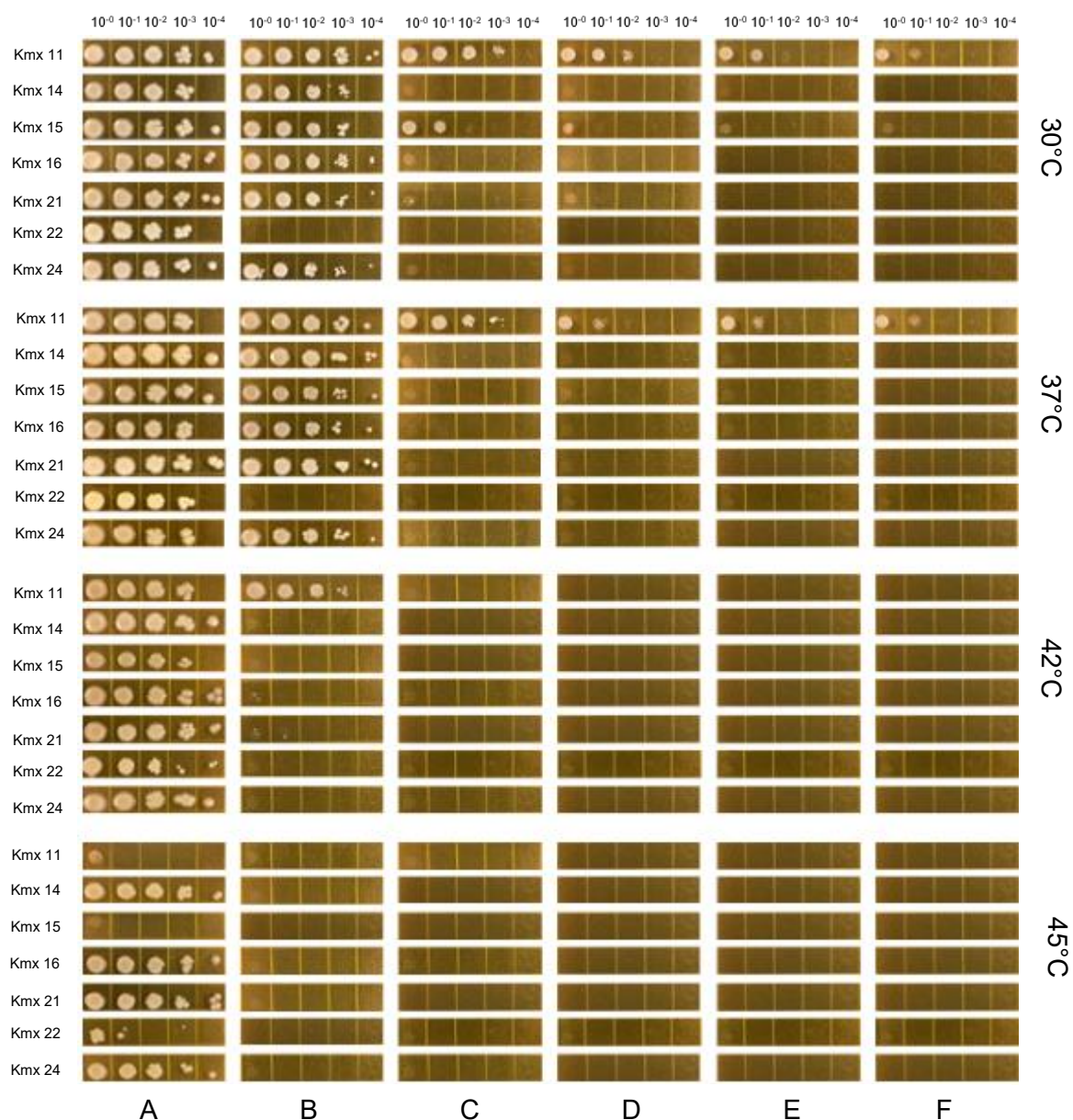


Figura 34. Susceptibilidad de las cepas de *K. marxianus* a diferentes concentraciones de CFW. A (0 mM), B (0.05mM), C (0.15mM), D (0.3mM), E (0.4mM) y F (0.5 mM) bajo diferentes temperaturas de incubación. En diluciones seriadas de 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Las temperaturas de incubación se encuentran a la derecha.

Partiendo de estas observaciones se redujo el rango de concentraciones de CFW (0, 0.05, 0.15, 0.3, 0.4 y 0.5 mM) para evaluar la susceptibilidad de la pared celular de las cepas a este colorante. La base fisiológica del crecimiento a alta temperatura no se conoce completamente. Sin embargo, algunos estudios indican que la

termotolerancia se basa en rasgos poligénicos (Cubillos et al., 2011; Lane et al., 2011). En este estudio, al evaluar la resistencia de las cepas de *K. marxianus* al CFW a diferentes temperaturas, se exploró la posible relación entre la estructura de la pared celular y la termotolerancia. Los resultados de la figura 35 muestran que a 30 y 37°C, la mayoría de las diluciones de las diferentes cepas crecieron bien en ausencia de CFW, con una disminución progresiva del crecimiento conforme aumentó la concentración del colorante y la temperatura de incubación, lo que indica una sensibilidad diferencial relacionada a la composición de la pared celular. A 42°C, la reducción del crecimiento fue evidente en todas las cepas, con una inhibición más pronunciada en concentraciones de CFW superiores a 0.15 mM. Finalmente, a 45°C únicamente las cepas Kmx 14, Kmx 16 y Kmx 21 presentaron crecimiento en la concentración B' (0.02 mM) siendo esta la menor concentración de CFW. Entre las cepas evaluadas, Kmx 11 y Kmx 15 mostraron la mayor resistencia al CFW a 30, 37 y 42°C, lo que sugiere que poseen una menor cantidad de quitina en su pared celular o que esta se encuentra menos expuesta al colorante. Sin embargo, a 42°C, su crecimiento fue más limitado, lo que indica una menor tolerancia a temperaturas elevadas en comparación con las otras cepas más sensibles al CFW. Por otro lado, Kmx 22 presentó la menor resistencia al CFW en todas las temperaturas probadas, lo que sugiere una mayor cantidad de quitina o una mayor exposición de esta en la estructura de la pared celular, haciéndola más susceptible al colorante. Estos resultados plantean una posible relación entre la estructura de la pared celular y la termotolerancia en *K. marxianus*. La menor resistencia al CFW en algunas cepas podría indicar una pared celular con mayor contenido de quitina, se sabe que, ante defectos en la pared celular, las células

incrementan la síntesis de quitina como un mecanismo compensatorio para mantener la integridad su integridad frente al estrés térmico (Alfatah et al., 2017). Sin embargo, este aumento en quitina también facilita la unión del CFW, lo que puede inhibir el crecimiento de levaduras.

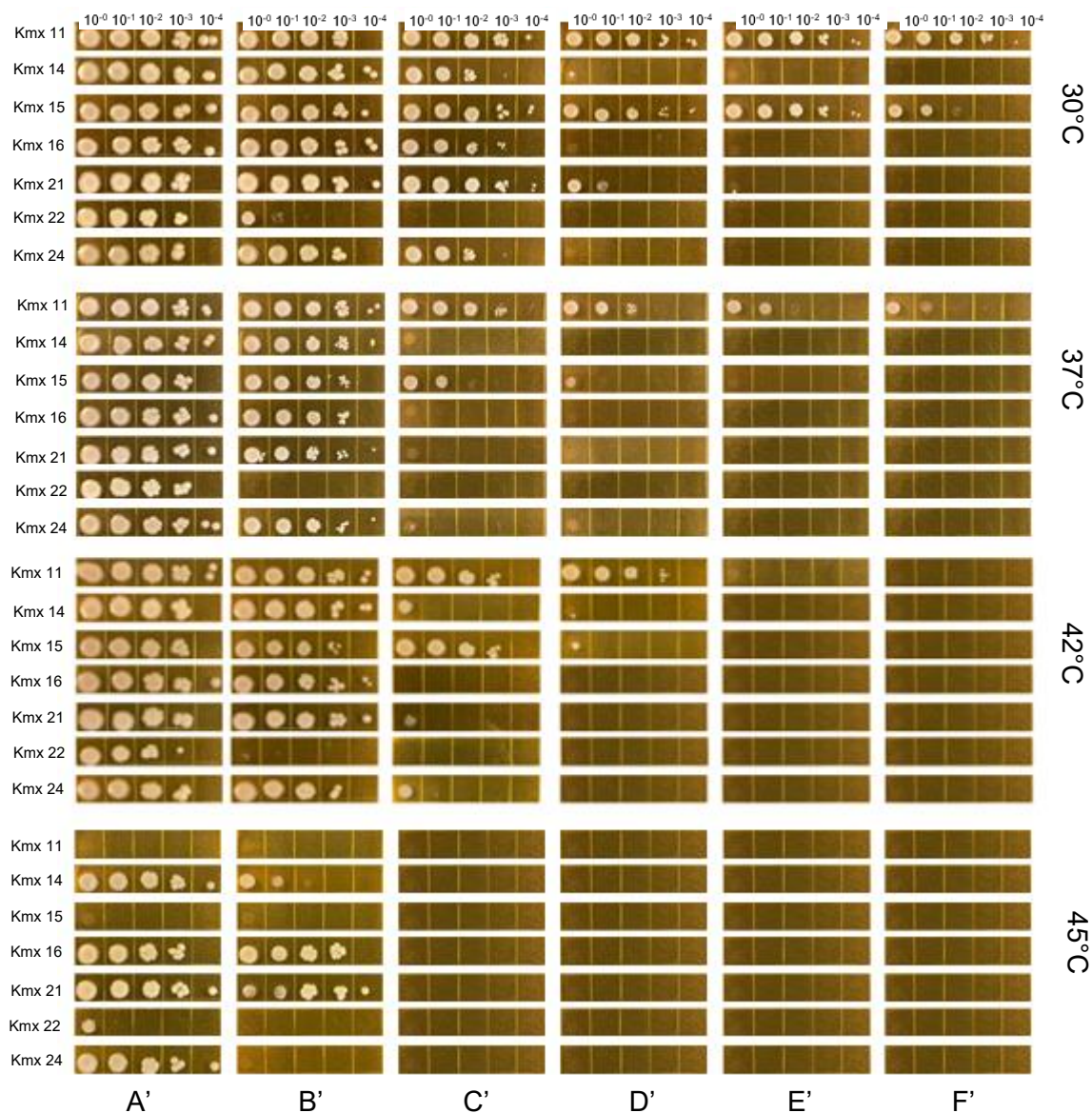


Figura 35. Susceptibilidad de las cepas de *K. marxianus* al CFW a diferentes temperaturas y concentraciones de CFW: A' (0 mM), B' (0.02mM), C' (0.05mM), D' (0.15mM), E' (0.2mM) y F' (0.5 mM) en diluciones seriadas de 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} .

Ensayo de sensibilidad a la liticasa

La liticasa es una enzima que degrada los componentes de la pared celular de levaduras y hongos, principalmente los polisacáridos de glucosa. Se utilizó un ensayo de sensibilidad a la liticasa para evaluar los cambios estructurales que sufre la pared celular de las cepas Kmx 14, Kmx 16, Kmx 21 y Kmx 22 cuando son cultivadas a distintas temperaturas. Se optó por descartar del estudio a las cepas Kmx 11 y Kmx 15 ya que posiblemente son otra especie dentro del género *Kluyveromyces*.

Para estos experimentos, las cepas se cultivaron a 30, 37, 42 y 45°C hasta alcanzar la fase media exponencial, partiendo de una densidad óptica (DO_{600nm}) inicial de 0.5. Las células recuperadas en fase fueron sometidas al ensayo de liticasa, siguiendo el protocolo descrito por Ribeiro et al., (2021), y se registró la DO_{600nm} a lo largo del ensayo. Esta digestión enzimática con liticasa debilita la estructura de la pared celular al romper los enlaces β -1,3-glucanos, sin dañar la membrana celular, lo que resulta en la formación de protoplastos (Pärnänen et al., 2024). Conforme avanza la digestión, la pérdida de integridad estructural de las células se refleja en una disminución progresiva de la DO_{600nm} , indicando la generación de protoplastos con menor absorbancia (Ribeiro et al., 2022). Si el tratamiento se prolonga y los cultivos se mantienen en agitación, los protoplastos pueden lisarse, liberando contenido celular.

Las alteraciones o cambios que ocurren en la pared celular de las levaduras se monitorearon en función de la susceptibilidad de la pared celular a la actividad de la liticasa. En el gráfico de la figura 36 se evidencia una disminución rápida de la

densidad óptica en los primeros 50 minutos, especialmente en las cepas Kmx 14, Kmx 16, Kmx 21 y Kmx 24, cuyos valores de DO_{600nm} se aproximan a 0.1 en ese intervalo de tiempo, indicando una mayor sensibilidad a la liticasa. En contraste, la cepa Kmx 22 mantuvo un valor de DO_{600nm} mayor a lo largo del ensayo, lo que sugiere una menor susceptibilidad a la acción enzimática y una posiblemente una mayor resistencia estructural de su pared celular. Las barras de error reflejan la variabilidad en las mediciones, con una mayor dispersión en los tiempos intermedios (entre 50 y 200 minutos), lo que podría atribuirse a diferencias en la respuesta celular entre réplicas biológicas. Hacia el final del experimento (300 min) la DO_{600nm} tiende a estabilizarse en valores cercanos a cero en la mayoría de las cepas, lo que indica una lisis celular completa. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la figura 37, donde se analiza la tasa de lisis, que refleja la velocidad con la que las células se degradaron en respuesta a la liticasa. Se observa que la cepa Kmx 21 presenta la mayor tasa de lisis (0.0042 min^{-1}), lo que refuerza su alta susceptibilidad a la degradación enzimática. La cepa Kmx mostró una tasa de lisis de 0.03 min^{-1} , y Kmx 14 y Kmx 24 de 0.025 min^{-1} y 0.023 min^{-1} , respectivamente, indicando en todos los casos una moderada respuesta a la liticasa, mientras que la cepa Kmx 22 mostró la menor tasa ($<0.01 \text{ min}^{-1}$) lo que señala una mayor resistencia a la degradación enzimática y sugiriendo una pared celular más robusta. La cepa Kmx 24 exhibió una tasa intermedia (0.025 min^{-1}), indicando una respuesta de lisis moderada.

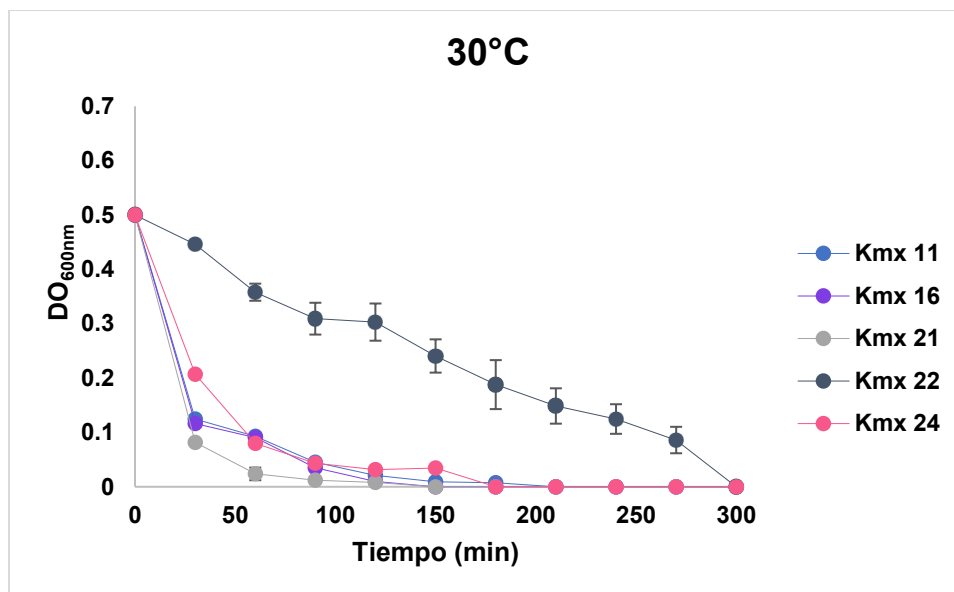


Figura 36. Sensibilidad a la litocasa de las cepas *K. marxianus* cultivadas a 30°C. El ensayo se realizó por triplicado, también se muestran las barras de error para cada punto.

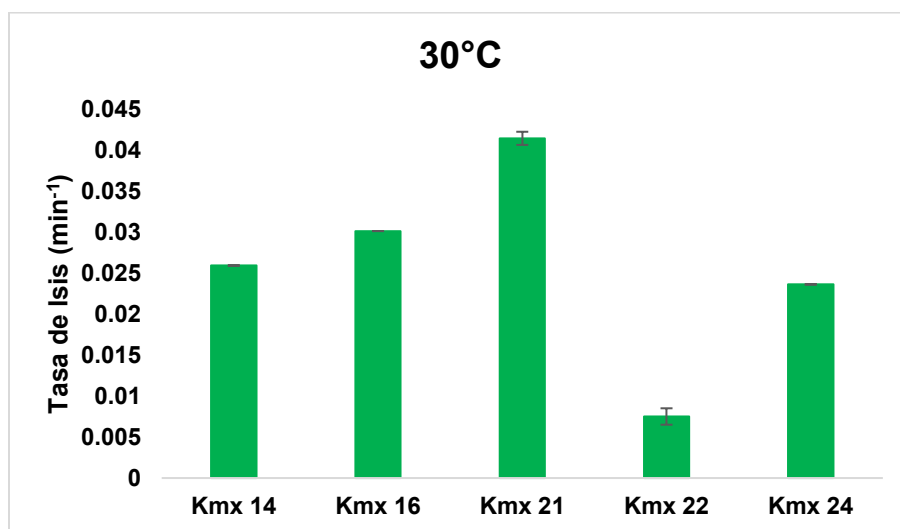


Figura 37. Tasas de lisis de las cepas autóctonas de *K. marxianus* que fueron cultivadas a 30°C.

El comportamiento de las cepas crecidas a 37°C se reporta en la figura 38. En ella se observa que Kmx 14, Kmx 16 y Kmx 24 presentaron los valores más bajos de DO_{600nm} a lo largo de todo el ensayo. El gráfico de tasa de lisis de la figura 39 refuerza estas observaciones ya que se destaca que las cepas Kmx 14 y Kmx 16 presentan las tasas de lisis más altas (0.004 min^{-1}), mientras que la cepa Kmx 22

exhibe la menor tasa de lisis ($<0.002 \text{ min}^{-1}$), lo que confirma su resistencia estructural.

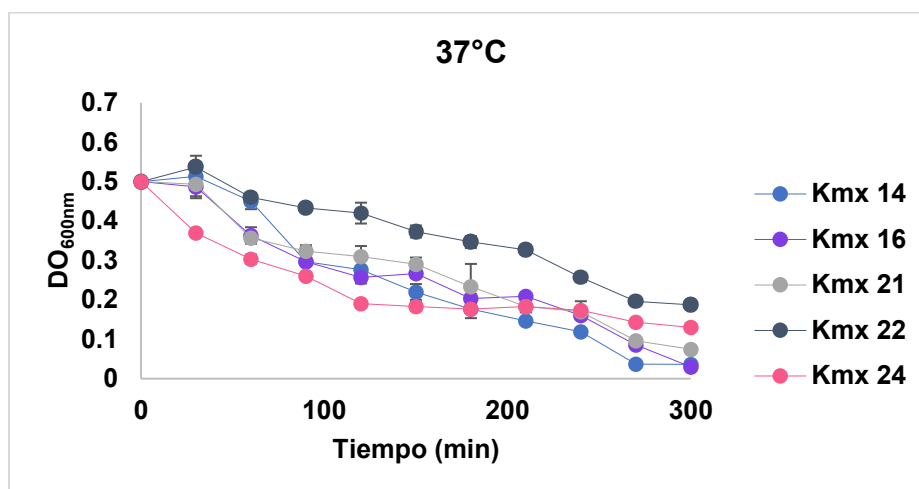


Figura 38. Sensibilidad a la litocasa de las cepas *K. marxianus* cultivadas a 37°C. El ensayo se realizó por triplicado, también se muestran las barras de error para cada punto.

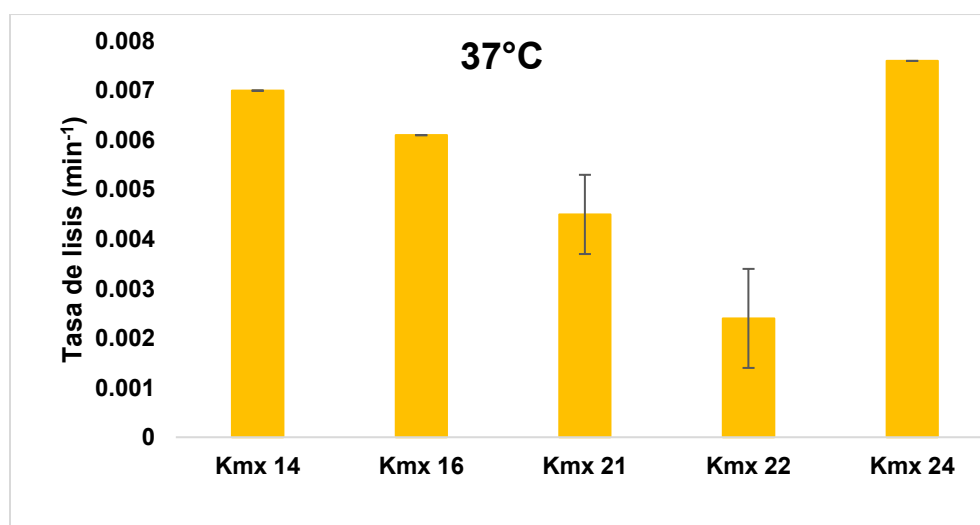


Figura 39. Tasas de lisis de las cepas autóctonas de *K. marxianus* que fueron crecidas 37°C.

En las figuras 40 y 41 se observa la disminución del valor de la DO a 600 nm y de la tasa de lisis, respectivamente, de todos los aislados cultivados a 40°C. Al comparar ambos gráficos se detecta una correlación entre la disminución en el valor de la DO a 600 nm y la tasa de lisis. Las cepas con mayor tasa de lisis (Kmx 22, Kmx 14 y Kmx 16) son aquellas cuya densidad óptica disminuyó más rápidamente

en el gráfico de la figura 40. Por el contrario, Kmx 24, que mostró una reducción más lenta en la DO_{600nm} , presenta también la menor tasa de lisis (0.0013 min^{-1}), lo que sugiere que su pared celular es menos susceptible a la degradación enzimática a 42°C . Es posible que las cepas más susceptibles a la lisis (Kmx 22, Kmx 14 y Kmx 16) presenten una pared celular menos rígida o con una menor cantidad de enlaces de β -glucanos, lo que facilita la acción de la liticasa. Por otro lado, la cepa Kmx 24, que muestra la menor tasa de lisis, podría haber desarrollado una pared celular más robusta y resistente a la degradación enzimática, lo que le conferiría una ventaja adaptativa en condiciones de estrés térmico.

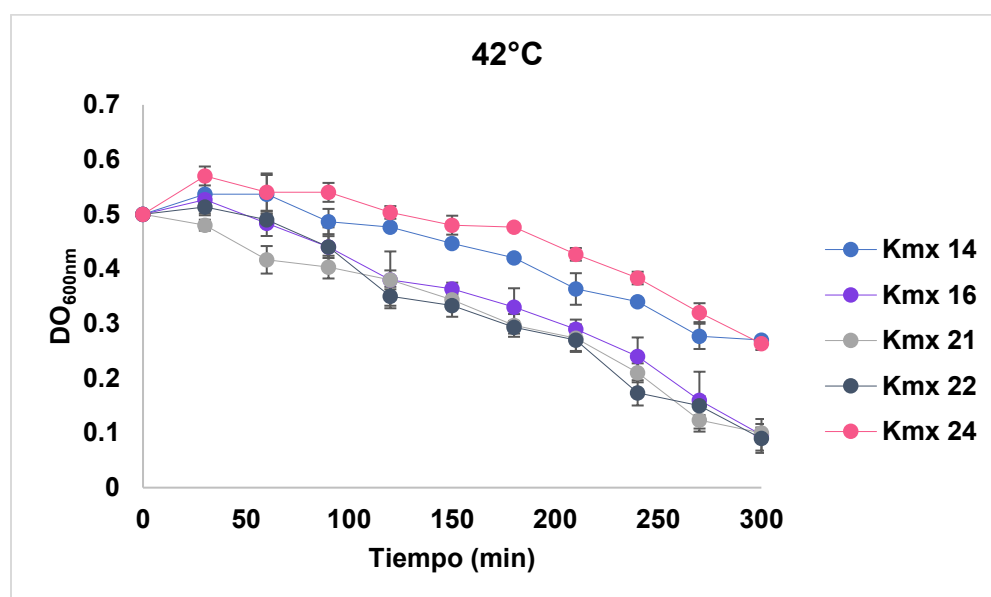


Figura 40. Sensibilidad a la liticasa de las cepas *K. marxianus* crecidas a 42°C . El ensayo se realizó por triplicado, también se muestran las barras de error para cada punto.

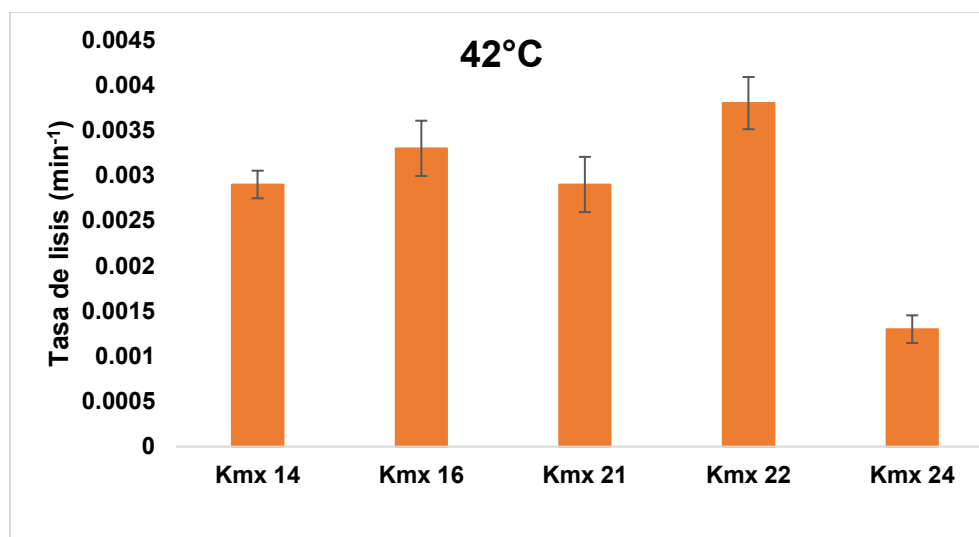


Figura 41. Tasas de lisis de las cepas autóctonas de *K. marxianus* que fueron cultivadas a 42°C.

En los gráficos de las figuras 42 y 43, se muestran los resultados obtenidos en la disminución del valor de DO_{600nm} y tasa de lisis en cepas crecidas a 45°C. En comparación con los resultados obtenidos a 42°C, se observa que la disminución de la densidad óptica fue más pronunciada, por lo que la temperatura de 45°C podría haber afectado la estructura de la pared celular de la mayoría de las cepas haciéndolas más susceptibles a la acción de la liticasa en la mayoría de las cepas. Sin embargo, la cepa Kmx 24 mantiene valores más altos de DO_{600nm} en los primeros minutos del ensayo, aunque posteriormente su tendencia converge con las demás. Este cambio en la susceptibilidad podría estar relacionado con modificaciones en los niveles de β -glucanos y quitina, que son los componentes clave en la resistencia a enzimas hidrolíticas. Es posible que, a 45°C, la estructura de la pared celular se vuelva menos densa o presente defectos en la reticulación de sus polímeros, facilitando así la acción de la liticasa.

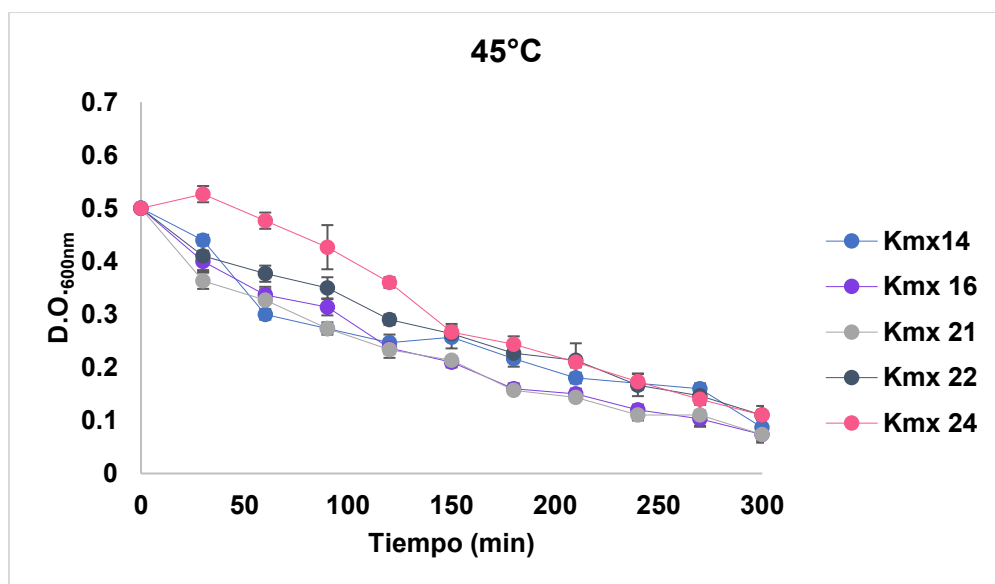


Figura 42. Sensibilidad a la litocasa de las cepas *K. marxianus* crecidas a 45°C. El ensayo se realizó por triplicado, también se muestran las barras de error para cada punto.

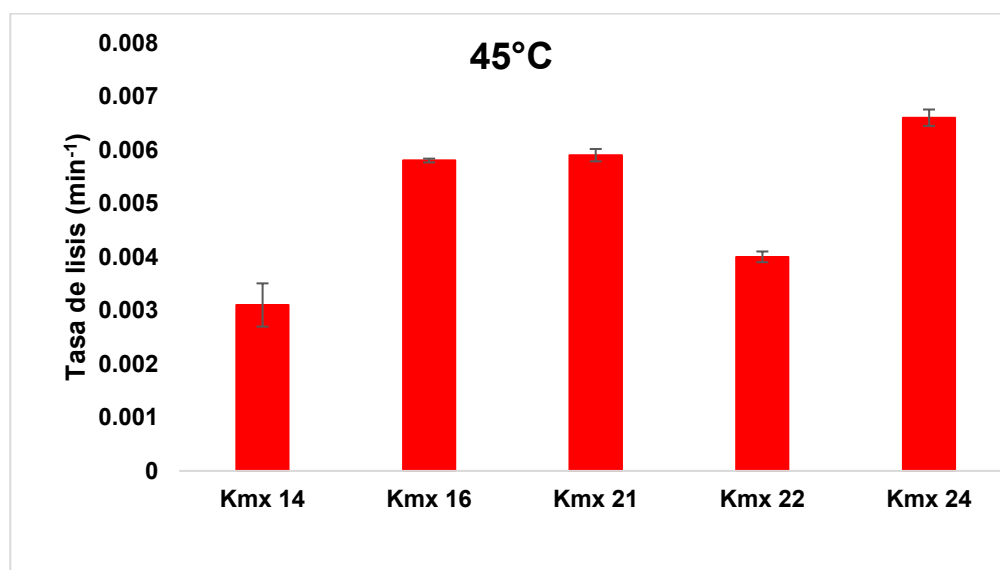


Figura 43. Tasas de lisis de las cepas autóctonas de *K. marxianus* que fueron crecidas 45°C.

En el resumen gráfico de las tasas de lisis de las cepas a distintas temperaturas se presenta en la figura 44.

El análisis de varianza (ANOVA) aplicado a las tasas de lisis de *K. marxianus* a diferentes temperaturas de crecimiento, permite evaluar la influencia de la temperatura y de la variabilidad entre las cepas en la susceptibilidad a la litocasa. En

la tabla 22, se observa que la variabilidad debida a la temperatura de crecimiento (filas) presenta una suma de cuadrados de 0.001709238, con un valor de F de 15.3185 y una probabilidad (p) de 0.0002. Este valor estadísticamente significativo ($p < 0.5$), indica que la temperatura de crecimiento afecta directamente la susceptibilidad de las células a la lisis enzimática. Por otro lado, el efecto de la cepa (columnas) muestra una suma de cuadrados de 0.000184948, con un valor de F de 1.2432 y una probabilidad p de 0.344. En este caso, el valor de p es mayor a 0.05, lo que indica que no hay diferencias significativas entre las distintas cepas en cuanto a su susceptibilidad a la litocasa. Por otro lado, el efecto de la variabilidad de las cepas (columnas) muestra una suma de cuadrados de 0.000184948, con un valor de F de 1.2432 y una probabilidad (p) > 0.05 , sugiere las diferencias entre las cepas no inciden en la susceptibilidad a la litocasa. Esto sugiere que la resistencia o sensibilidad a la lisis está más influenciada por la temperatura de crecimiento que por la variabilidad genética entre cepas.

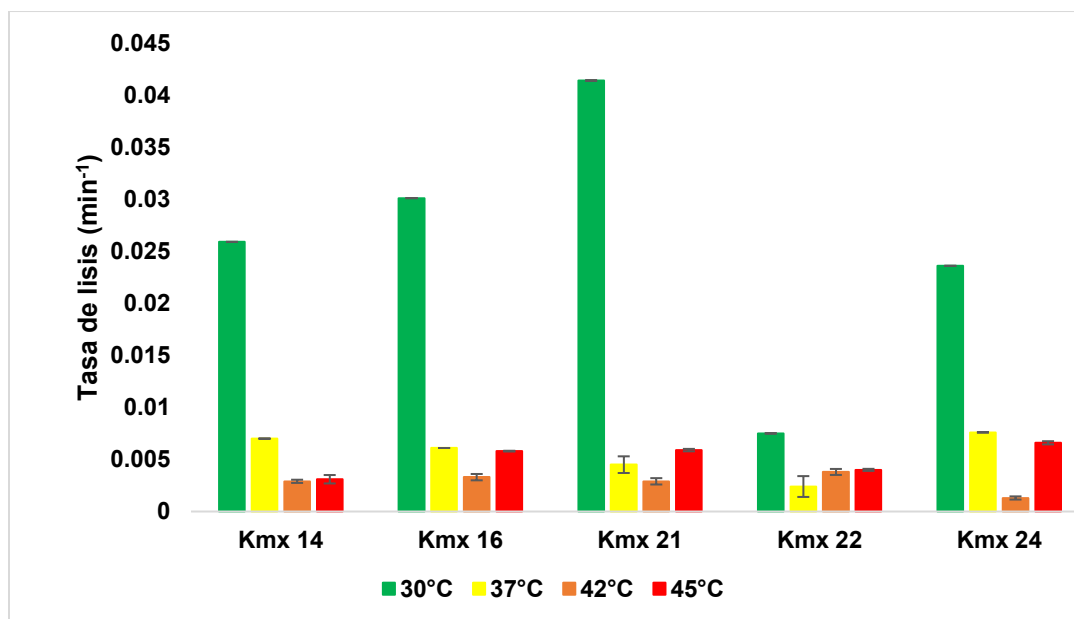


Figura 44. Tasas de lisis de las cepas autóctonas de *K. marxianus* que fueron crecidas a distintas temperaturas. El ensayo se realizó por triplicado, también se muestran las barras de error para cada punto.

Tabla 22. Análisis de varianza (ANOVA) de las tasas de lisis de *K. marxianus* crecidas a diferentes temperaturas

Origen de las variaciones		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
						<i>Valor crítico para F</i>
Filas	1.71E-03	3	5.70E-04	15.32	0.00	
Columnas	1.85E-04	4	4.62E-05	1.24	0.34	3.49E+00
Error	4.46E-04	12	3.72E-05			3.26E+00
Total	2.34E-03	19				

De acuerdo con lo reportado por Ribeiro et al. (2021), el aumento en la temperatura de cultivo induce una respuesta adaptativa en la pared celular de las levaduras. En este proceso, se activan mecanismos de transcripción de genes involucrados en la síntesis y remodelación de los componentes estructurales de la pared celular, tales como *FKS1* y *ROM2*, relacionados con la síntesis de 1,3-β-glucano; *KRE6*, implicado en la síntesis de 1,6-β-glucano; *GAS1*, responsable de la elongación y ramificación del 1,3-β-glucano; y *CHS1* y *CHS5*, involucrados en la síntesis de quitina. La activación de estos genes conduce a una mayor producción de estos componentes, lo que refuerza la integridad de la pared celular y mejora la resistencia de las células al estrés térmico. En concordancia con estos hallazgos, Simões et al. (2003) señalan que estudios de expresión génica global han demostrado que las levaduras son capaces de modificar la composición y estructura de su pared celular como respuesta adaptativa frente a condiciones ambientales adversas. Esta reorganización es un proceso altamente dinámico que funciona como un

mecanismo protector frente a condiciones adversas y agentes que alteran la estabilidad de la pared celular, incluyendo mutaciones. Esta modificación estructural está asociada con un aumento en la expresión de Spi1p y Sed1p, proteínas de la pared celular ancladas a glicosilfosfatidilinositol "GPI"). Estas proteínas de la pared celular GPI-CWP se unen covalentemente al 1,6- β -glucano, cuyas cadenas altamente ramificadas se localizan en la superficie externa de la red de 1,3- β -glucano. Estas estructuras establecen enlaces adicionales con el 1,3- β -glucano o a la quitina, lo que da como resultado una fuerte unión covalente de las proteínas GPI-CWP a la capa externa de la pared celular (Simões et al., 2003) (Figura 6, en sección de antecedentes).

Cuando las levaduras se expusieron a 42°C, todas mostraron la menor tasa de lisis celular, lo que indica una mayor resistencia a la liticasa y una remodelación significativa de la pared celular, lo que también coincidió con la mayor tasa de lisis observada. En cambio, a 30°C, temperatura considerada sin estrés térmico, las células mostraron mayor sensibilidad a la liticasa indicando una pared no reforzada. Simões et al., (2003), reportaron un fenómeno similar en levaduras adaptadas a condiciones ácidas frente a la liticasa (1,3B-glucanasa). Ellos analizaron cómo la disminución del pH externo modificaba la organización molecular de la pared celular y encontraron que las células aumentaban su resistencia a la lisis porque la capa interna del glucano se volvía menos accesible a la enzima. Este efecto se debía a que el ácido reducía la permeabilidad de la pared celular. En un estudio de Nobel et al. (1990), se observó que un pH ambiental bajo afectaba significativamente la organización de la pared celular de *S. cerevisiae*. La resistencia podría atribuirse a

un mayor número de enlaces entre las moléculas de β -glucano y la quitina. Otra posibilidad es que la capa proteica externa de la pared celular, que limita el acceso de la β 1,3-glucanasa a la capa interna de glucano, se volvió menos permeable, induciendo rápidamente una resistencia a esta enzima.

Identificación *in silico* de genes implicados en la remodelación de la pared celular de *K. marxianus*

En la literatura se han reportado algunos genes asociados a la remodelación y construcción de la pared celular de la levadura modelo *S. cerevisiae*. Estos genes están involucrados en la síntesis de 1-3 β -glucanos (*FKS1*, *ROM2*), la síntesis de 1-6 β -glucanos (*KRE6*), la elongación y ramificación de 1-3 β -glucanos (*GAS1*), la síntesis de quitina (*CHS1*, *CHS5*) y manosilación de proteínas de la pared celular (*MNN2*, *MNN9*, *MNN11*, *KTR4*) (Ribeiro et al., 2021).

Con base en estos antecedentes, se eligieron únicamente a los genes implicados en la remodelación de la pared celular *RML1*, *FKS1*, *BGL2*, *CHS3*, *CRH1*, *GAS1* y *PRM5* de *S. cerevisiae* 288C para buscarlos en el genoma de *K. marxianus* DMKU3-1042 que es genoma de referencia de esta especie (genoma completo depositado en NCBI con el identificador NC_036025.1). Los resultados de esta búsqueda se muestran en la tabla 23 en la cual se indican también las funciones de los genes encontrados.

Tabla 23. Genes ortólogos implicados en la remodelación de pared celular encontrados en *K. marxianus* DMKU3-1042.

Gen	Función	% identidad con las secuencias de <i>S. cerevisiae</i>	
		nucleótidos	aminoácidos
*RLM1	Factor de transcripción MADS-box; componente de la vía de la MAP quinasa mediada por la proteína quinasa C, implicada en el mantenimiento de la integridad celular; fosforilada y activada por la MAP quinasa Slp2p.	---	---
Pi1p (KLMA 10537 en DMKU3 1042)	Codifica un miembro de la familia de proteínas de la pared celular ancladas al glicosilfosfatidilinositol (GPI).	---	60
FKS1	Componente de 1,3-beta-glucano sintasa, participa en la biosíntesis de 1,3-beta-glucanos	78.8	80.3
BGL2	Glucano 1, participa en la organización celular y la biogénesis	75.7	74
CHS3	Quitina sintasa 3	62.4	60
CRH1	Probable glucosidasa CRH1	58	56.7
GAS1	Codifica una β -1,3-glucanosiltransferasa, enzima importante para la remodelación de la pared celular que implica la elongación de las cadenas de (1 $\rightarrow$ 3)- β - D-glucano y la ramificación	67	70.0
*PRM5	Sello distintivo de la activación de la vía CWI. Su papel biológico es desconocido.	---	---

*Genes presentes en *S. cerevisiae*, pero ausentes en *K. marxianus* DMKU3 1042.

De los genes enlistados en la tabla 23, únicamente *RLM1* y *PRM5* no fueron encontrados en el genoma de DMKU3-1042. Se ha reportado que *RLM1* está involucrado en la transducción de señales; activa la expresión genética en respuesta al estrés de la pared celular y al calor en *S. cerevisiae* (Jung et al., 2002). En cambio, *PRM5* es una proteína integral de membrana, cuyo papel biológico es desconocido.

Los genes *FKS1*, *BGL2*, *CHS3*, *CRH1* y *GAS1*, identificados en la cepa *K. marxianus* DMKU3-1042, fueron localizados en los borradores genómicos de las cepas autóctonas Kmx 15, Kmx 14, Kmx 16, Kmx 22 y Kmx 24. Hasta la fecha, no

existen reportes específicos que describan o analicen en profundidad la síntesis de la pared celular en *K. marxianus*, lo que resalta la importancia de estos hallazgos.

En el presente estudio, se llevó a cabo la búsqueda de estos genes debido a su posible papel como marcadores clave en la síntesis y remodelación de la pared celular, lo que permitiría ampliar el conocimiento sobre la arquitectura y dinámica de esta estructura en *K. marxianus* en estudios futuros. Dado que la pared celular juega un papel fundamental en la termotolerancia y resistencia a la lisis celular, la presencia de estos genes podría estar relacionada con la capacidad de estas cepas para sobrevivir y adaptarse a temperaturas elevadas. Los resultados de las figuras 39 a 43 muestran que las cepas crecidas a temperaturas más altas presentan una menor tasa de lisis, lo que sugiere que la pared celular se vuelve más resistente a la degradación enzimática conforme aumenta la temperatura de cultivo o incubación. Esto coincide con estudios previos en los que se ha reportado que la exposición a estrés térmico induce una respuesta adaptativa en las levaduras, promoviendo la transcripción de estos genes relacionados con la síntesis y remodelación de la pared celular. En este contexto, la localización de los genes en los borradores genómicos de las cepas autóctonas de *K. marxianus*, reportada en el Anexo IV, proporciona evidencia molecular que podría explicar la mayor resistencia a la lisis observada en las cepas cultivadas a temperaturas elevadas.

III. Desarrollo de un protocolo de transformación para cepas autóctonas de *K. marxianus*.

a) Estudio bibliográfico

Para desarrollar un sistema eficiente de transformación e integración de genes aislados autóctonos de *K. marxianus*, se realizó una revisión de diversos protocolos disponibles en la literatura. La tabla 24 presenta un cuadro comparativo de los métodos encontrados. Los aspectos más relevantes que se analizaron fueron: el método de transformación utilizado; la obtención y preparación de ADN plantilla que se integrará al genoma; la temperatura de cultivo para preparar las células competentes; la temperatura de choque térmico en la transformación y los medios de selección de las candidatas transformantes.

Tabla 24. Protocolos de transformación de *K. marxianus* hallados en la literatura

Método	Obtención de ADN plantilla	Temperatura de cultivo	Temperatura de choque térmico	Medios de cultivo	Selección de transformantes	Referencia
Q	PCR	28-30°C	42°C	YPD	30°C YPD agar- URA ²	Hoshida, Murakami, et al., 2014.
E	Digestión con enzimas de restricción	30°C	NA	YPD	30°C YPD- agar/G418/ X-Gal ³	Ribeiro et al., 2007.

² URA⁺ indica que la cepa posee una copia funcional del gen URA3, lo que le permite crecer en este medio.

³ G418 es un antibiótico utilizado para seleccionar células que contienen el gen de resistencia KanMX. X-Gal es un sustrato cromogénico que permite detectar actividad β -galactosidasa; las colonias positivas adquieren una coloración azul.

E	PCR	30°C	NA	YPD	30°C YPD- agar/G418	Chang et al., 2012; Sánchez et al., 1993
E	PCR	30°C	NA	YPD	37°C YPD- agar/G418	Bragança et al., 2014; Sánchez et al., 1993
Q	Digestión con enzimas de restricción	30°C	37°C	YPD	25, 30, 37, 42 y 45°C YPD- agar/Zeocina	Lee et al., 2018; Sánchez et al., 1993
Q	Digestión con enzimas de restricción	37°C y 250 rpm	37-42°C	YPD	30°C YPD- agar/ G418	Sabido-Ramos, 2021
P	PCR	30°C	5°C	YPD Sorbitol 0.8M	30°C YPD- agar	Lyu et al., 2021
Q	PCR	28°C	47°C por 15 min	YPD	28°C Placas selectivas (MM-U ⁴) y PCR	Abdel-Banat et al., 2021a
Q	PCR	28°C	42°C, 47°C y 49°C	YPD	28-30°C por 2-3 días. Placas selectivas MM-U	Abdel-Banat et al., 2010a
E: Electroporación Q: Quimiotransformación P: Transformación de protoplasto						

En el análisis de los diferentes protocolos se encontró que la electroporación es un método poco empleado en *K. marxianus* y que, en su mayoría, se reporta el uso de transformación química (quimiotransformación) mediada por LiAc/ssDNA/PEG (Abdel-Banat et al., 2010, 2021; Antunes et al., 2000; Gietz, 2014; Rajkumar &

⁴ MM-U indica medio mínimo sin uracilo. URA⁺ señala que la cepa posee un gen URA3 funcional que le permite crecer en ausencia de este compuesto.

Morrissey, 2022). Este método ha demostrado ser más simple y eficaz en *K. marxianus*, lo que lo convierte en la opción preferida en la mayoría de los estudios reportados (Lyu et al., 2021). A diferencia de la electroporación, que requiere de un equipo especializado y parámetros ajustados con precisión, el uso de acetato de litio es más sencillo y produce resultados satisfactorios en esta especie, facilitando la manipulación genética sin comprometer la viabilidad de las células. Además de la electroporación, se descartó también la transformación de protoplastos debido a su complejidad, altos costos y baja reproducibilidad (Lyu et al., 2021).

Tras seleccionar la quimiotransformación mediada por LiAc/ssDNA/PEG, se llevó a cabo la búsqueda de protocolos detallados de quimiotransformación utilizados en cepas de *K. marxianus* y *S. cerevisiae* con el fin de elaborar un protocolo consensuado promedio (Tabla 25).

Tabla 25. Protocolos de quimiotransformación mediada por LiAc/PEG/ssDNA.

Condiciones de cultivo para la preparación de competentes	Solución para la transformación	Parámetros para el choque térmico	Condiciones para la recuperación	Medio para la selección de células transformantes	Referencia
Las células se incubaron a 28°C y crecidas hasta la fase estacionaria (16-17 h) y 150 rpm.	Agua destilada estéril Polietilenglicol 3350 (PEG) al 40 % p/v Acetato de litio (LiAc) 200 mM Ditiotreitol (DTT) 100 mM	15 min a 47°C	No hay recuperación en medio líquido	Placas de medio SD (-U) ⁵	(Abdel-Banat et al., 2021)
Las células se incubaron a 30°C de 3.5 a 4.5 h	Agua destilada estéril Polietilenglicol 3350 (PEG) al 50 % p/v	40 min a 42°C	En 1 mL de YPD a 30°C durante	YPD+higromicina	(Rajkumar & Morrissey, 2022)

⁵ SD (-U) corresponde a medio sintético definido sin uracilo.

partiendo de un valor de 0.5 en su densidad óptica a 600 nm	Acetato de litio 110 mM 500 ng de plásmido		2.5 h y agitación.	(calentar placas a 30°C antes de inocular) Inocular 300 uL puros y el resto en diluciones 1/5 y 1/10	
Cultivar células en 1.5 mL (16 h) de medio YPD.	200 ug de acarreador de DNA Polietilenglicol 4000 (PEG) al 40 % p/v 100 mM LiAc DTT 10 mM	15 min a 47°C	No hay recuperación	Centrifugar y Resuspender en 1 mL de agua destilada en placas selectivas	(Antunes et al., 2000)
Las células fueron incubadas a 28°C hasta la fase estacionaria (16-17 h) a 150 rpm	25-50 ng de DNA 1 mg/mL de acarreador de DNA Polietilenglicol 3350 (PEG) al 40 % p/v 200 mM LiAc DTT 100 mM	40 min a 42°C	No hay recuperación	Placas selectivas MM (-U) incubadas a 28 y 30°C de 2 a 3 días.	(Abdel-Banat et al., 2010)
Inocular en 2 mL e incubar a 30°C con agitación durante la noche	Agua destilada estéril 100 ng de DNA 2 mg/mL de acarreador de DNA Polietilenglicol 3350 (PEG) al 50 % p/v 1 M LiAc DTT 100 mM	20 min a 42°C	No hay recuperación	Incubar las placas selectivas a 30 °C durante 2 a 4 días	(Gietz, 2014)

La quimiotransformación mediada por LiAc/PEG/ssDNA es un método muy utilizado para introducir ADN exógeno en levaduras. Este proceso usa tres componentes principales: acetato de litio (LiAc), polietilenglicol (PEG) y ADN de cadena sencilla (ssDNA), para aumentar la permeabilidad de la membrana celular y facilitar la entrada del ADN exógeno. El LiAc es una sal que altera la permeabilidad de la membrana plasmática de las células de la levadura, haciéndola más receptiva a la entrada de ADN exógeno (Antunes et al., 2000). Este proceso también puede desestabilizar la pared celular, facilitando la absorción de ADN. El PEG es un polímero que favorece el contacto entre las células de levadura y el ADN exógeno.

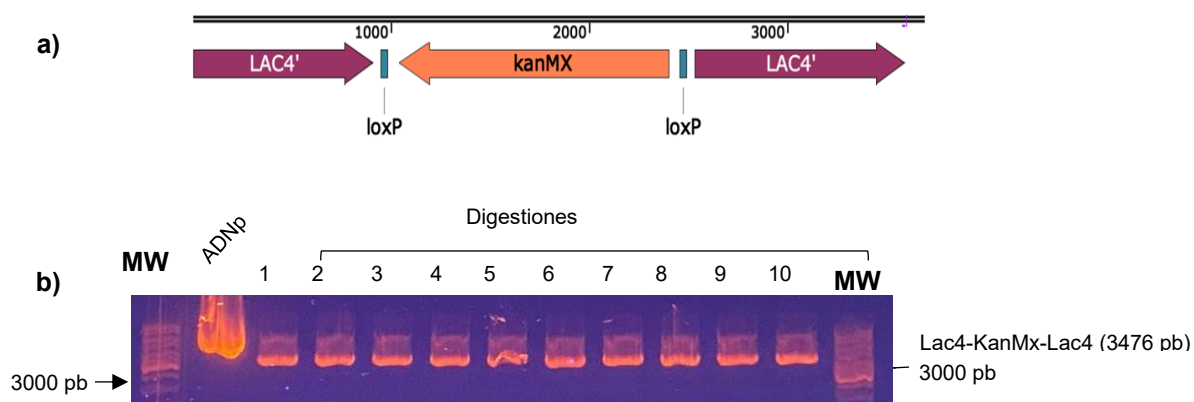
En otros términos, facilita la "coagulación" del ADN en la superficie celular, lo que aumenta la probabilidad de que el ADN entre a las células. El PEG también actúa promoviendo una mayor fusión entre las membranas celulares y el ADN (Liu & Friesen, 2012). Por su parte, el ssDNA tiene un papel protector ya que ayuda a bloquear las nucleasas que podrían degradar el ADN exógeno y también promueve la interacción entre el ADN foráneo y la membrana celular (Gietz, 2014).

Después de incubar las células en la mezcla de LiAc, PEG y ssDNA, las células se someten a un choque térmico, que implica elevar rápidamente la temperatura, facilitando que el ADN atraviese la membrana celular alterada y se introduzca en el interior de la célula (Rahimzadeh et al., 2016). Tras la transformación, las células se colocan en un medio adecuado para permitir la regeneración de su membrana y pared celular y la expresión de la resistencia al antibiótico de selección (en su caso). Finalmente, las candidatas transformantes se seleccionan mediante marcadores genéticos específicos, por ejemplo, mediante resistencia a antibióticos o la restauración de una función metabólica en medios de cultivo selectivos carentes de algún nucleótido o aminoácido. Por ejemplo, cepas de *S. cerevisiae* con delección en el gen URA3 (URA⁻) no pueden crecer en medio sintético definido sin uracilo (SD-U). Sin embargo, al ser transformadas con un plásmido que contiene una copia funcional del gen URA3 (URA⁺), recuperan la capacidad de sintetizar uracilo y, por lo tanto, crecer en dicho medio selectivo. De manera similar, la resistencia a G418 permite seleccionar células transformadas con el marcador de resistencia KanMX, mientras que la inclusión de X-Gal permite identificar aquellas que expresan la enzima β -galactosidasa, a través de la formación de colonias azules.

b) Obtención del cassette Lac4-KanMx-Lac4

De acuerdo con Ribeiro et al., (2007), el cassette Lac4-KanMx-Lac4 fue diseñado a partir del sistema *Cre-loxP*, herramienta que permite el rescate de marcadores genéticos. En *K. marxianus* CBS 6556 se ha demostrado que este sistema permita la interrupción del gen *LAC4*, que codifica la actividad β -galactosidasa en *Kluyveromyces*.

En el presente estudio se obtuvo el ADN a integrar, del cassette Lac4-KanMx-Lac4, empleando dos métodos diferentes. El primero consistió en la digestión enzimática del vector pGEM-Lac4-KanMx-Lac4 con la enzima *NotI* para aislar el cassette Lac4-KanMx-Lac4. En la figura 45b se muestra la digestión en gel de agarosa, obteniéndose una banda de 3476 pb como se esperaba, de acuerdo con el mapa de la misma figura 45a. El segundo método implicó la obtención del cassette Lac4-KanMx-Lac4 mediante amplificación por PCR utilizando como ADN plantilla al vector pUC18-Lac4KanMx. En la figura 45c se muestra el fragmento correspondiente al cassette de interés.



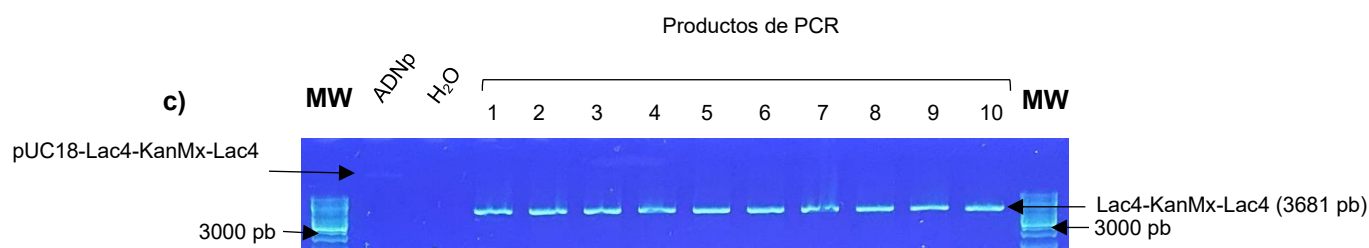


Figura 45. Confirmación de la obtención del cassette de interrupción Lac4-KanMx-Lac4. a) Cassette de interrupción Lac4-KanMx-Lac4. Las regiones homólogas de LAC4 son de 763 y 672 pb. b) Digestiones del vector pGEM-Lac4-KanMx-Lac4 con enzima NotI; el segundo carril corresponde al ADNp sin digerir; de 1-10 corresponde a las digestiones, es decir, sólo Lac4-KanMx-Lac4. c) Productos de PCR correspondientes al fragmento Lac4-KanMx-Lac4 (1-10) con un tamaño esperado de 3681 pb obtenido de pUC18Lac4-KanMx-Lac4.

Luego de corroborar la correcta digestión o amplificación por PCR del cassette de interrupción, se realizó su purificación, extracción y cuantificación. Debido al número de pruebas requeridas para estandarizar el protocolo de transformación, se optó por utilizar el ADN obtenido por ambos métodos.

Tabla 26. Cantidad total de ADN obtenido.

Vector	Método	Producto	µg de ADN
pGEM-Lac4-KanMx-Lac4	Digestión	Lac4-KanMx-Lac4	29.45 µg
pUC18-Lac4KanMx	PCR	Lac4-KanMx-Lac4	13 µg

c) Análisis de la eficiencia de transformación y confirmación de interrupción de LAC4.

Tras realizar la transformación con el cassette de interrupción siguiendo el protocolo detallado en la sección de materiales y métodos, se observó el crecimiento de candidatas transformantes en la tabla 27 en las pruebas 2, 3, 4 y 5. En dicha tabla se resumen: 1. Las condiciones experimentales de cada prueba. 2. El recuento de

colonias blancas obtenidas. 3. El número de colonias blancas obtenidas. 4. La eficiencia de transformación. 5. el número de transformantes por microgramo de ADN (UFC/μg).

En esta tabla se reportan dos tiempos de recuperación diferentes (2.5 y 20 horas) ya que Russell et al. (1993) demostraron que el número de transformantes resistentes a G418 aumentaban con el tiempo de recuperación (20-25 horas) en *K. lactis*, mismo efecto que se observó en esta prueba. En la prueba 1 no se detectó crecimiento en el medio selectivo YPD agar que contenía geneticina (sulfato G418) [200 μg/mL] y X-Gal [40 μg/mL]. La geneticina se emplea como un antibiótico selectivo luego para identificar y seleccionar las transformantes que contienen el marcador de resistencia KanMx. La literatura reporta concentraciones de G418 en medios selectivos que varían desde los 100 μg/mL (Nambu-Nishida et al., 2017) hasta los 200 μg/mL (Ren et al., 2022; Ribeiro et al., 2007). Por consiguiente, se decidió realizar un ensayo de resistencia a la geneticina (G418) en las cepas autóctonas de *K. marxianus* para determinar la concentración adecuada para seleccionar a las transformantes. Los resultados mostraron una concentración mínima inhibitoria de 10 μg/mL en cepas silvestres de *K. marxianus* respecto a la geneticina.

Tabla 27. Condiciones y resultados de pruebas de quimiotransformación mediada por LiAc/ssDNA/PEG utilizando el cassette de disrupción Lac4-KanMx-Lac4.

Prueba	Cepa	T° cultivo (°C)	Choque térmico (°C)	Tiempo de recuperación (h)	# de colonias	Eficiencia de transformación (UFC/μg)
1	Kmx 24	30	42	2.5	0	NA
			47	20	0	NA
		42	42	2.5	0	NA
			47	20	0	NA

2	Kmx 24	30	42	2.5	8	8×10^2
				20	22	2.2×10^2
			47	2.5	6	6×10^2
		42		20	10	1×10^2
			42	2.5	5	5×10^1
			47	20	5	5×10^1
3	Kmx 24	30	47	2.5	7	7×10^1
				20	10	1×10^2
4	Kmx 16	30	47	2.5	6	6×10^1
				20	20	2×10^2
	CBS 6556	30	47	2.5	13	1.3×10^2
				20	25	2.5×10^2
5	CBS 6556	30	47	20	13	1.3×10^2

En la prueba 2, se utilizaron concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL de geneticina para seleccionar las transformantes. Se detectó crecimiento de colonias blancas únicamente en el medio selectivo que contenía 25 µg/mL de antibiótico. Además, se observó que una temperatura de cultivo de 30°C, combinada con un choque térmico a 47°C durante 15 min, produjo un mayor número de transformantes de hasta 8×10^2 UFC/µg de ADN.

Abdel-Banat et al. (2010) evaluaron el efecto de la temperatura y duración del choque térmico sobre la eficiencia de transformación de *K. marxianus*. Encontraron que reducir el tiempo de choque térmico a 15 min y aumentar la temperatura a 47°C mejoraba la eficiencia de transformación en la cepa DMKU3-1042 de *K. marxianus*. Se observó el mismo efecto en la cepa KMS2 de *K. marxianus* en un estudio realizado por Antunes et al., (2000) en el que se reportó una eficiencia de transformación de 1.9×10^3 UFC/µg de ADN. Por lo tanto, la prueba 3 consistió

aplicar las mismas temperaturas de cultivo (30°C), choque térmico (47°C durante 15 minutos) y tiempos de incubación para la recuperación de las células (después de 2.5 y 20 horas) que en la prueba 2 con el fin de corroborar la reproducibilidad del protocolo. En esta prueba se obtuvo una eficiencia de transformación de 1×10^2 UFC/ μ g de ADN. Estos primeros experimentos fueron realizados con la cepa diploide Kmx 24. En la prueba 4 se aplicó el protocolo de transformación en las cepas Kmx 16 y CBS 6556. Este cambio se realizó con el propósito de evaluar si existían diferencias en la eficiencia de transformación entre una cepa diploide (Kmx 24) y una haploide (Kmx 16). La cepa CBS 6556 se utilizó como cepa de referencia o control, ya que ha sido considerada como tal en el estudio de Ribeiro et al., (2007). La cepa Kmx 16 consiguió una eficiencia de 2×10^2 UFC/ μ g de ADN, en cambio CBS 6556 obtuvo una eficiencia de 2.5×10^2 y 2.6×10^1 UFC/ μ g de ADN en esta prueba. En la prueba 5, únicamente se trabajó con la cepa control CBS 6556 para llevar a cabo la estandarización completa del protocolo y determinar su reproducibilidad. La eficiencia de transformación se mantuvo en el mismo orden de magnitud con 1.3×10^2 UFC/ μ g de ADN. El cassette de disrupción Lac4-KanMx-Lac4 posee dos regiones homólogas al gene LAC4 (Ribeiro et al., 2007) de *K. marxianus* (Gondim Martins et al., 2002). La disrupción de LAC4 interrumpe la actividad β -galactosidasa de LAC4 en las cepas Kmx 16, Kmx 24 y CBS 6556, resultando en cepas mutantes que contienen marcadores selectivos externos como lo es KanMx (gene de resistencia a la geneticina G418) (O. Ribeiro et al., 2007).

La β -galactosidasa muestra una alta afinidad por la porción de galactosa, y como resultado, el sustrato cromogénico hidroliza X-Gal, liberando el indol sustituido que

se dimeriza espontáneamente para formar un producto insoluble de color azul intenso (Figura 46) (Julin, 2018). En un medio de cultivo que contiene X-Gal, las colonias con β -galactosidasa activa se tornan azules debido a esta reacción (Juers et al., 2012) mientras que las colonias sin actividad enzimática permanecen blancas (Ribeiro et al., 2007). Los medios selectivos fueron adicionados con X-Gal [40 μ g/mL] permitiendo la selección de colonias transformantes (blancas) con actividad β -galactosidasa interrumpida por el cassette Lac4-KanMx-Lac4.

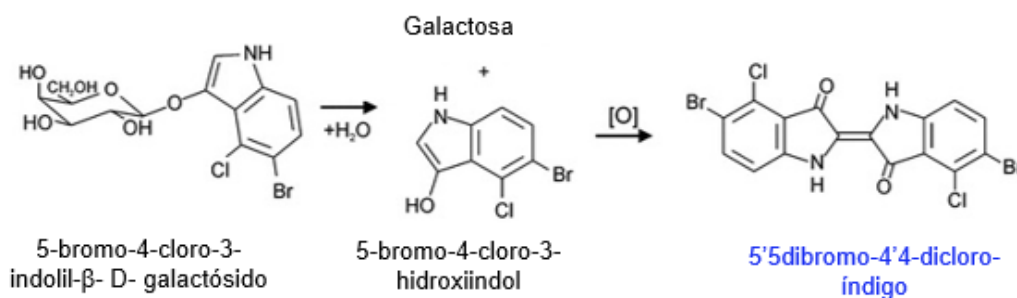


Figura 46. Estructura de X-Gal y productos de hidrólisis (Julin, 2018).

La confirmación de la correcta inserción del cassette de interrupción, que contiene el marcador selectivo KanMx, se realizó mediante PCR diagnóstica. Para ello, en la figura 47b se muestra que se utilizó ADN genómico como molde y los oligonucleótidos Kan3 y Kan4 para amplificar un producto de 500 pb. Además, en la figura 47a se observa que se empleó el conjunto de oligonucleótidos LAC4 (Fwr) ASR y LAC4 (Rev) ASR para amplificar el cassette de interrupción completo de tamaño 3580 pb. Las pruebas diagnósticas se realizaron en las candidatas transformantes de la prueba 5 (colonias 2 y 3).

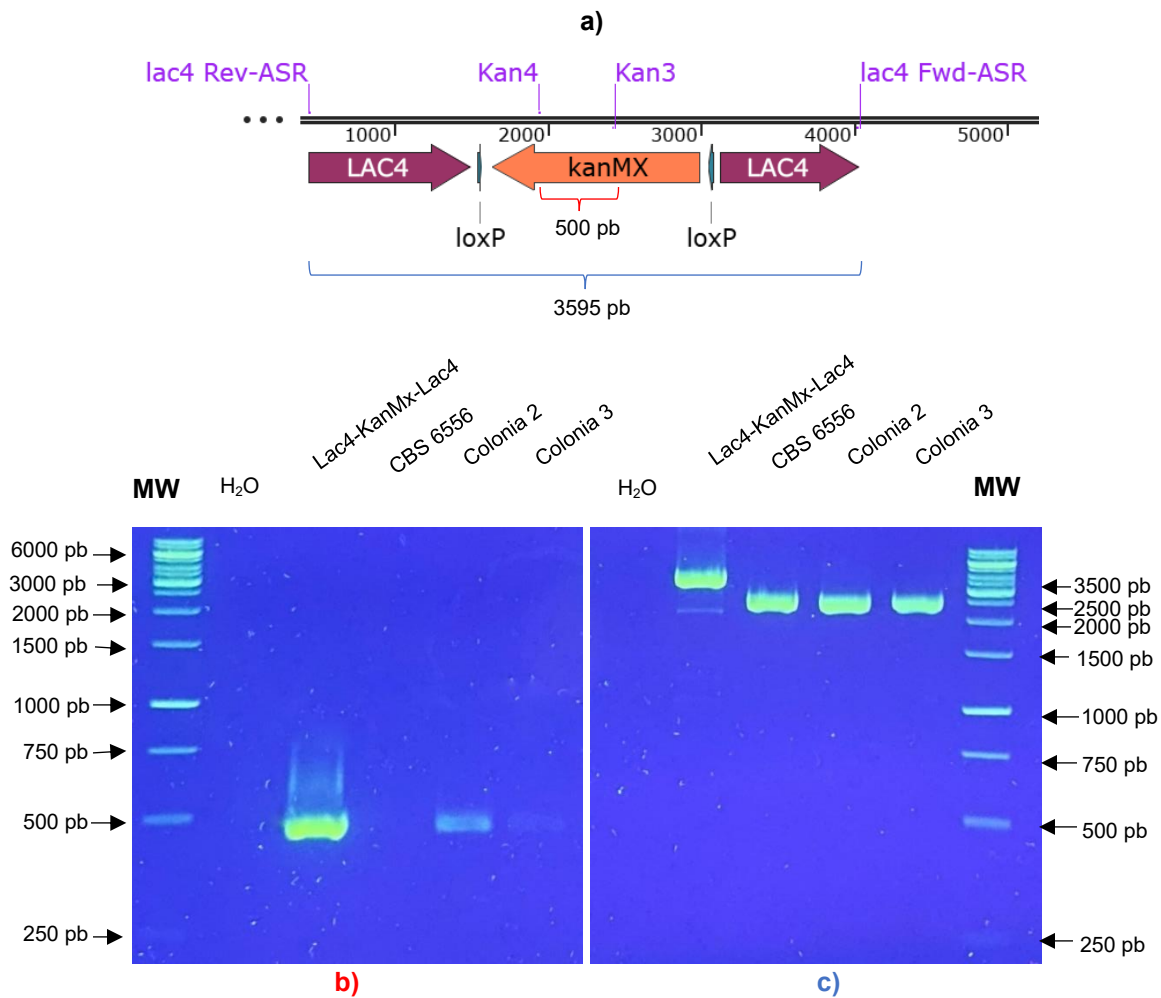


Figura 47. Prueba de la interrupción del gen LAC4 en candidatas transformantes de CBS 6556. a) Cassette de interrupción Lac4-KanMx-Lac4; b) Productos de PCR de marcador selectivo KanMx en candidatas transformantes; c) Productos de PCR de cassette Lac4-KanMx-Lac4 completo. El control positivo para ambos casos fue Lac4-KanMx-Lac4 y los controles negativos: H₂O y ADN_g de cepa control CBS 6556.

En la figura 47b se observa la presencia de una banda de 500 pb en las colonias 2 y 3, correspondiente al marcador selectivo KanMx, mismo que se encuentra presente en el control positivo (Lac4-KanMx-Lac4). En la figura 47c se observan los productos de PCR del cassette de interrupción; el producto amplificado de las colonias 2 y 3 tiene un tamaño aproximado de 2500 pb al igual que CBS 6556 lo cual quiere decir que no se insertó el cassette en LAC4 ya que no corresponde al

tamaño esperado para LAC4 interrumpido. Ribeiro et al., (2007) informaron que la amplificación del gen LAC4 salvaje conduce a un fragmento de 2434 pb, tamaño similar al de las bandas obtenidas en el gel de electroforesis (Figura 47c), además mencionan que más de una copia del gen LAC4 podría estar presente en el genoma de esta cepa en particular y por esta razón era necesaria al menos una segunda ronda de transformación con Lac4-KanMx-Lac4, para obtener la interrupción de todos los alelos LAC4. El análisis del borrador del genoma de las cepas Kmx 16 y Kmx 24 proporcionó información suficiente para identificar los alelos LAC4 presentes. En Kmx 16 se encontró una copia completa del gen LAC4 (Figura 48a) en el contig 15 de 447,626 pb, mientras que en Kmx 24 se localizó en el contig 10 de 564,598 pb (Figura 48b).

Se comprobó la presencia del gen del marcador de resistencia KanMx en el genoma de las transformantes de la cepa CBS 6556. Sin embargo, este marcador no se encontró interrumpiendo el gen LAC4 por lo que la integración del cassette fue en otro sitio no homólogo del genoma, probablemente por NHEJ que es el mecanismo preferente de recombinación de ADN en cepas silvestres de *K. marxianus* como ya ha sido reportado por Abdel-Banat et al., (2010) entre otros autores. La preferencia por el mecanismo de NHEJ en esta especie ha dificultado su manipulación genética. *K. marxianus* puede ser transformada con fragmentos de ADN no homólogos a través de la recombinación ilegítima (IR), que utiliza la vía NHEJ. En los transformantes resultantes, los fragmentos de ADN se insertan en varias localizaciones cromosómicas. Estos dos mecanismos existen con frecuencias variadas en diferentes cepas de levadura (Ding et al., 2020), lo cual explica muy

seguramente la integración ectópica del marcador KanMx en las candidatas transformantes de las cepas Kmx 16, Kmx 24 y CBS 6556 de este estudio.

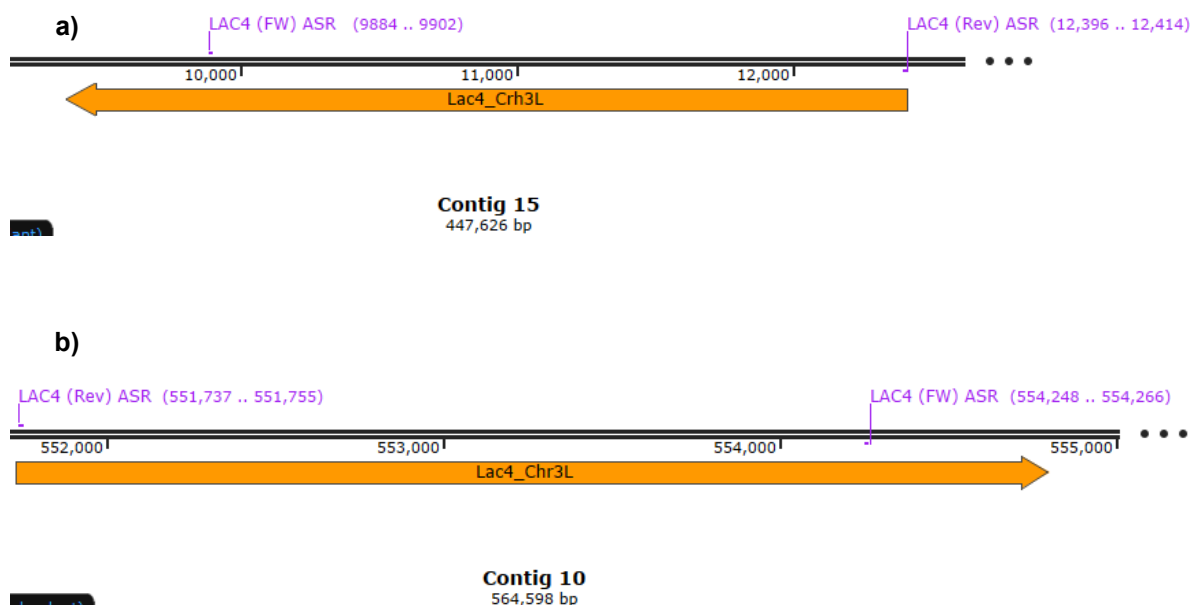


Figura 48. Gen LAC4 en los genomas de las cepas Kmx 16 y Kmx 24. a) Kmx 16. b) Kmx 24.

Abdel-Banat et al. (2010) demostraron que la vía NHEJ es el mecanismo predominante de reparación de DSB de ADN en *K. marxianus*, e identificaron que la inhibición de esta vía en DMKU3-1042 altera el proceso de integración de genes aleatorios y da como resultado una mayor eficiencia de transformación de secuencias lineales de ADN obteniendo 2.5×10^6 transformantes/ μ g de ADN. Reportes recientes emplean cepas de *K. marxianus* con un sistema NHEJ inactivado por CRISPR/CAS9 que permite una inactivación muy rápida y eficiente de esta vía mediante la eliminación de la proteína ku70 ((Rajkumar & Morrissey, 2022).

VI. Conclusiones

Se comprobó que la ploidía celular fue diploide para las cepas Kmx 14, Kmx15, Kmx 22 y Kmx 24 mientras que Kmx16 es haploide tipo a. Todas las cepas crecieron hasta 45°C con excepción de Kmx 11 y Kmx 15 que mostraron una menor tolerancia (hasta 42°C) tanto en medio sólido como en líquido. La tasa máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) fue a 42°C. Aunque las cepas Kmx 11 y Kmx 15 provienen de nichos térmicos diferentes (pulque en lugar de henequén) y presentan un rango menor de termotolerancia, ambas alcanzaron la mayor tasa máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) a 42°C.

Se sugiere que las cepas Kmx 11, Kmx 15 y Kmx 22 presentan un alto contenido de quitina debido a su baja resistencia al CFW. En contraste, las cepas Kmx 14, Kmx 16, Kmx 21, Kmx 24 y CBS 6556, que mostraron una mayor resistencia, probablemente tienen un menor contenido de quitina en la estructura de su pared celular debido a diferencias en el arreglo o la interacción de las proteínas y polisacáridos que conforman la pared celular. Otra posibilidad es que la quitina no esté igual de accesible en las cepas debido a arreglo diferente de las proteínas y polisacáridos de pared.

Si se considera que a 30°C las levaduras no se exponen a un estrés por temperatura, no existe en principio la necesidad de un reforzamiento de pared celular. A esta temperatura que se observó la mayor tasa de lisis probablemente porque la liticasa entra en contacto casi directo con los 1,3 β -glucanos provocando una rápida ruptura celular. Las cepas Kmx 14, Kmx 16, Kmx 21 y Kmx 24 presentaron este comportamiento, lo que sugiere un bajo reforzamiento de la pared

celular. Por el contrario, a 42°C estas mismas cepas mostraron mayor resistencia a la liticasa, es decir la menor tasa de lisis celular, indicando aumento en la resistencia de la pared. Este ensayo plantea la posibilidad de que la pared celular de las levaduras sufra cambios estructurales en respuesta a la temperatura.

La eficiencia de transformación e integración cromosomal con el protocolo probado aumentó al realizar el choque térmico a 47°C. Aunque se lograron avances importantes en la comprensión de las condiciones óptimas para la transformación e integración a cromosoma de cepas de *K. marxianus*, aún persisten desafíos en la inserción precisa de cassettes de disrupción en estas cepas autóctonas o silvestres.

VII. Perspectivas

Como parte de las futuras investigaciones, se propone diseñar nuevos oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR del *locus* MAT en la cepa Kmx 11, basados en la estructura de los genes identificados en el borrador del genoma de la cepa Kmx 15. El objetivo es generar resultados robustos que apoyen la hipótesis de que estas cepas podrían representar una nueva especie dentro del género *Kluyveromyces*. La obtención de datos sólidos en esta área permitiría avanzar en la caracterización taxonómica de estas levaduras, con importantes implicaciones para su estudio evolutivo y aplicaciones biotecnológicas.

Es necesario llevar a cabo una evaluación más detallada de la expresión de genes involucrados en la síntesis y remodelación de la pared celular, utilizando técnicas de qRT-PCR para cuantificar los niveles de transcripción a 30 y 42°C. Esto permitiría identificar los mecanismos moleculares que regulan la formación de la pared celular,

especialmente bajo condiciones de estrés por temperatura. Para complementar estos estudios, se recomienda cuantificar el contenido de polisacáridos en la pared celular mediante técnicas avanzadas, como la microscopía de fluorescencia, lo que proporcionaría una visión más completa sobre las adaptaciones estructurales de las cepas de *K. marxianus* en respuesta a la temperatura.

Por otra parte, se espera implementar herramientas innovadoras de edición genética, como el sistema CRISPR/Cas9, para modificar específicamente el gen KU70 involucrado en el proceso de reparación de ADN por NHEJ. La eliminación de este gen podría aumentar la eficiencia de transformación, facilitando la integración dirigida de ADN exógeno en el genoma de estas cepas lo que representaría un avance significativo en el desarrollo de nuevas cepas de levadura con aplicaciones tanto industriales como de investigación. Este conjunto de estudios no solo contribuiría a una mayor comprensión de la biología de las cepas autóctonas de *K. marxianus*, sino que también abriría nuevas oportunidades para su explotación en procesos biotecnológicos, donde la tolerancia a la temperatura y la capacidad de transformación eficiente son características clave.

VIII. Referencias

- Abdel-Banat, B. M. A., Nonklang, S., Hoshida, H., & Akada, R. (2010). Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 27(1), 29–39. <https://doi.org/10.1002/YEA.1729>
- Abdel-Banat, B. M. A., Hoshida, H., & Akada, R. (2021). Various short autonomously replicating sequences from the yeast *Kluyveromyces marxianus* seemingly without canonical consensus. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100053. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2021.100053>
- Alcazar, E. M., Alcázar V, E. M., Arrizon G, J. P., Gschaedler M, A. C., & Lugo C, E. C. (2016). Extraction and quantification of the yeast cell wall polysaccharides. 14(2). www.e-gnosis.udg.mxwww.ciatej.mx
- Alfatah, M., Bari, V. K., Nahar, A. S., Bijlani, S., & Ganesan, K. (2017). Critical role for CaFEN1 and CaFEN12 of *Candida albicans* in cell wall integrity and biofilm formation. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep40281>
- Antunes, D. F., De Souza, J., & De Moraes, J. (2000). A simple and rapid method for lithium acetate-mediated transformation of *Kluyveromyces marxianus* cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(7), 653–654. <https://doi.org/10.1023/A:1008984403732/METRICS>
- Anwar, M. I., Muhammad, F., Awais, M. M., & Akhtar, M. (2019). *World's Poultry Science Journal A review of β -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry A review of β -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry*. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000241>

- Astell, C. R., Ahlstrom-Jonasson, L., Smith, M., Tatchell, K., Nasmyth, K. A., & Hall, B. D. (1981). The sequence of the DNAs coding for the mating-type *loci* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 27(1 PART 2), 15–23. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90356-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90356-1)
- Baptista, M., & Domingues, L. (2022). Kluyveromyces marxianus as a microbial cell factory for lignocellulosic biomass valorisation. *Biotechnology Advances*, 60, 108027. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2022.108027>
- Barsoum, E., Martinez, P., & A, S. U. (n.d.). *a3, a transposable element that promotes host sexual reproduction*. <https://doi.org/10.1101/gad.557310>
- Barsoum, E., Martinez, P., & Åström, S. U. (2010). $\alpha 3$, a transposable element that promotes host sexual reproduction. *Genes & Development*, 24(1), 33–44. <https://doi.org/10.1101/GAD.557310>
- Bilal, M., Ji, L., Xu, Y., Xu, S., Lin, Y., Iqbal, H. M. N., & Cheng, H. (2022). Bioprospecting Kluyveromyces marxianus as a Robust Host for Industrial Biotechnology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.851768>
- Bragança, C. R. S., Colombo, L. T., Roberti, A. S., Alvim, M. C. T., Cardoso, S. A., Reis, K. C. P., de Paula, S. O., da Silveira, W. B., & Passos, F. M. L. (2014). Construction of recombinant *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 to express dengue virus type 1 nonstructural protein 1 (NS1). *Applied Microbiology and Biotechnology* 2014 99:3, 99(3), 1191–1203. <https://doi.org/10.1007/S00253-014-5963-5>
- Butler, G., Kenny, C., Fagan, A., Kurischko, C., Gaillardin, C., & Wolfe, K. H. (2004). Evolution of the MAT locus and its Ho endonuclease in yeast species (Vol. 101, Issue 6). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0304170101

- Chang, J.-J., Ho, C.-Y., Ho, F.-J., Tsai, T.-Y., Ke, H.-M., Wang, C. H.-T., Chen, H.-L., Shih, M.-C., Huang, C.-C., & Li, W.-H. (2012). PGASO: A synthetic biology tool for engineering a cellulolytic yeast. *Biotechnology for Biofuels* 2012 5:1, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-53>
- Conde-Báez, L., Castro-Rosas, J., Villagómez-Ibarra, J. R., Páez-Lerma, J. B., & Gómez-Aldapa, C. (2016). Evaluation of Waste of the Cheese Industry for the Production of Aroma of Roses (Phenylethyl Alcohol). *Waste and Biomass Valorization* 2016 8:4, 8(4), 1343–1350. <https://doi.org/10.1007/S12649-016-9654-6>
- Conde-Ferráez, L. (2007). El locus MAT (mating-type) de los ascomicetos: Su evolución, estructura y regulación. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(2), 95–99. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70021-9](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70021-9)
- Cubillos, F. A., Billi, E., Zörgö, E., Parts, L., Fargier, P., Omholt, S., Blomberg, A., Warringer, J., Louis, E. J., & Liti, G. (2011). Assessing the complex architecture of polygenic traits in diverged yeast populations. *Molecular Ecology*, 20(7), 1401–1413. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2011.05005.X>
- Davis, A. J., & Chen, D. J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational Cancer Research*, 2(3), 130. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2218-676X.2013.04.02>
- Deive, F., Costas, M., & Longo, M. (2003). Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Letón.*, 25, 1403–1406.
- Ding, L., Macdonald, H. D., Smith, H. O., Hutchison, C. A., Merryman, C., Michael, T. P., Abramson, B. W., Kannan, K., Liang, J., Gill, J., Gibson, D. G., & Glass, J. I. (2020a). Gross chromosomal rearrangements in *Kluyveromyces marxianus* revealed by illumina and oxford nanopore

- sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1–10.
<https://doi.org/10.3390/ijms21197112>
- FJ-Ram, A., & Klis, F. M. (2006). Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature Protocols*, 1(5), 2253–2256.
<https://doi.org/10.1038/NPROT.2006.397>
- Fleet, G. H. (1985). Composition and Structure of Yeast Cell Walls. *Current Topics in Medical Mycology*, 1, 24–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-9547-8_2
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008 79:3, 79(3), 339–354. <https://doi.org/10.1007/S00253-008-1458-6>
- Fukuhara, H. (2006). *Kluyveromyces lactis* - A retrospective. *FEMS Yeast Research*, 6(3), 323–324.
<https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2005.00012.X>
- Galinari, É., Sabry, D. A., Sasaki, G. L., Macedo, G. R., Passos, F. M. L., Mantovani, H. C., & Rocha, H. A. O. (2017). Chemical structure, antiproliferative and antioxidant activities of a cell wall α -d-mannan from yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1298–1305.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.11.015>
- Geralda Da Silva, E., de Fátima Borges, M., Medina, C., Hilsdorf Piccoli, R., & Freitas Schwan, R. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, 5(9), 859–865. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSYR.2005.02.006>
- Gietz, R. D. (2014). Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. *Methods in Molecular Biology*, 1163, 33–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0799-1_4

- Gombert, A. K., Madeira, J. V., Cerdán, M. E., & González-Siso, M. I. (2016). *Kluyveromyces marxianus* as a host for heterologous protein synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14), 6193–6208. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7645-y>
- Gondim Martins, D. B., De Souza, C. G., Ardaillon Simões, D., & De Morais, M. A. (2002). The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose. *Current Microbiology*, 44(5), 379–382. <https://doi.org/10.1007/s00284-001-0052-2>
- Gupta, V. K., Zeilinger, S., Ferreira Filho, E. X., Durán-Dominguez, M. C., & Purchase, D. (2014). *Microbial Applications : Recent Advancements and Future Developments*. <https://eds.uam.elogim.com/eds/ebookviewer/ebook/ZTAwMHh3d19fMTQ1ODk3MV9fQU41?sid=3a6c4cf4-5f91-4474-9d3f-76d8bd5af2fd@sdv-sessmgr01&vid=2&format=EK&rid=2>
- Haber, J. E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191(1), 33–64. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.111.134577>
- Hartland, R. P., Vermeulen, C. A., Sietsma, J. H., Wessels, J. G. H., & Klis, F. M. (1994). The linkage of (1-3)-beta-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 10(12), 1591–1599. <https://doi.org/10.1002/YEA.320101208>
- He, L., Feng, J., Lu, S., Chen, Z., Chen, C., He, Y., Yi, X., & Xi, L. (2017). Genetic transformation of fungi. *The International Journal of Developmental Biology*, 61(6–7), 375–381. <https://doi.org/10.1387/IJDB.160026LH>
- Hernández, Y., & Martínez, A. (2012). Transformación genética de eucariotas. *Kuxulkab*, 35, 1–14. <http://ri.ujat.mx/bitstream/20.500.12107/2336/1/-257-190-A.pdf>

- Hoshida, H., Fujita, T., Murata, K., Kubo, K., & Akada, R. (2014). Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry Copper-Dependent Production of a *Pycnoporus coccineus* Extracellular Laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. 69(6), 1090–1097.
<https://doi.org/10.1271/bbb.69.1090>
- Hoshida, H., Murakami, N., Suzuki, A., Tamura, R., Asakawa, J., Abdel-Banat, B. M. A., Nonklang, S., Nakamura, M., & Akada, R. (2014). Non-homologous end joining-mediated functional marker selection for DNA cloning in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. Ye. *Yeast*, 31(1), 29–46.
<https://doi.org/10.1002/yea.2993>
- Hoşoğlu, M. İ. (2018). Study of increasing the production of volatile flavor compounds by the yeast *Kluyveromyces marxianus* through optimization of carbon and nitrogen sources. *Food and Health*, 4, 112–123.
- Johnson, E. A., & Echavarri-Erasun, C. (2011a). Yeast Biotechnology, in The Yeasts, a Taxonomic Study. In Elsevier (Ed.), *The Yeasts* (5th ed.).
- Johnson, E. A., & Echavarri-Erasun, C. (2011b). Yeast Biotechnology. *The Yeasts*, 1, 21–44.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00003-3>
- Juere, D. H., Matthews, B. W., & Huber, R. E. (2012). LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. In *Protein Science* (Vol. 21, Issue 12, pp. 1792–1807). <https://doi.org/10.1002/pro.2165>
- Julin, D. A. (2018). Blue/white selection. In *Molecular Life Sciences*. Springer New York.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1531-2>

- Jung, U. S., Sobering, A. K., Romeo, M. J., & Levin, D. E. (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Molecular Microbiology*, 46(3), 781–789. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03198.x>
- Karim, A., Gerliani, N., & Aider, M. (2020). *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108818. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108818>
- Kawai, S., Hashimoto, W., & Murata, K. (2010). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered Bugs*, 1(6), 395–403. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.6.13257>
- Kidwell, M. G. (2005). Transposable Elements. *The Evolution of the Genome*, 165–221. <https://doi.org/10.1016/B978-012301463-4/50005-X>
- Klis, F. M., Boorsma, A., & de Groot, P. W. J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 23(3), 185–202. <https://doi.org/10.1002/YEA.1349>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2012). *The Yeasts : A Taxonomic Study*. 5th Ed. Amsterdam : Elsevier Science. <https://eds.b.ebscohost.com/eds/ebookviewer/ebook/ZTAWMHh3d19fMzUxMzMzMzX19BTg2?sid=065c9bce-8703-489b-a74b-47aa2292114a@sessionmgr101&vid=6&format=EK&rid=4>
- Kwiatkowski, S., Thielen, U., Glenney, P., & Moran, C. (2009). A Study of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Glucans. *Journal of the Institute of Brewing*, 115(2), 151–158. <https://doi.org/10.1002/J.2050-0416.2009.TB00361.X>
- Lappe-Oliveras, P., Avitia, M., S, S. D., Castillo-plata, A. K., Pedraza, L., Baquerizo, G., & Borgne, S. Le. (2023). Genotypic and Phenotypic Diversity of *Kluyveromyces marxianus* Isolates

Obtained from the Elaboration Process of Two Traditional Mexican Alcoholic Beverages

Derived from Agave : Pulque and Henequen (Agave fourcroydes) Mezcal. *Journal of Fungi*, 9(8), 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof9080795>

- Lane, M. M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K. H., O’Byrne, C. P., & Morrissey, J. P. (2011). Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 100(4), 507–519. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9606-x>
- Lane, M. M., & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister’s shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24(1–2), 17–26. <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2010.01.001>
- Lee, M.-H., Lin, J.-J., Lin, Y.-J., Chang, J.-J., Ke, H.-M., Fan, W.-L., Wang, T.-Y., & Li, W.-H. (2018). Genome-wide prediction of CRISPR/Cas9 targets in *Kluyveromyces marxianus* and its application to obtain a stable haploid strain. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-25366-Z>
- Leonel, L. v., Arruda, P. v., Chandel, A. K., Felipe, M. G. A., & Sene, L. (2021). *Kluyveromyces marxianus*: a potential biocatalyst of renewable chemicals and lignocellulosic ethanol production. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 41, Issue 8, pp. 1131–1152). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1917505>
- Lieber, M. R., Gu, J., Lu, H., Shimazaki, N., & Tsai, A. G. (2014). Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcellular Biochemistry*, 50, 279–296. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3471-7_14
- Li, D., Tang, Y., Lin, J., & Cai, W. (2017a). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12934-017-0785-7/TABLES/5>

Li, D., Tang, Y., Lin, J., & Cai, W. (2017b). Methods for genetic transformation of filamentous fungi.

Microbial Cell Factories 2017 16:1, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12934-017-0785-7>

Löser, C., Urit, T., Stukert, A., & Bley, T. (2013). Formation of ethyl acetate from whey by

Kluyveromyces marxianus on a pilot scale. *Journal of Biotechnology*, 163(1), 17–23.

<https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2012.10.009>

Lozančić, M., Žunar, B., Hrestak, D., Lopandić, K., Teparić, R., & Mrša, V. (2021). Systematic comparison of cell wall-related proteins of different yeasts. *Journal of Fungi*, 7(2), 1–19.

<https://doi.org/10.3390/JOF7020128>

Lyu, Y., Wu, P., Zhou, J., Yu, Y., & Lu, H. (2021). Protoplast transformation of *Kluyveromyces*

marxianus. *Biotechnology Journal*, 2100122. <https://doi.org/10.1002/BIOT.202100122>

Mustafa, T. (2014). *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*.

https://www.researchgate.net/publication/285598626_Yeast_Biotechnology_Diversity_and_Applications

Nambu-Nishida, Y., Nishida, K., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2017). Development of a comprehensive set of tools for genome engineering in a cold- And thermo-tolerant *Kluyveromyces marxianus* yeast strain. *Scientific Reports*, 7(1).

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-08356-5>

Novačić, A., Vučenović, I., Primig, M., & Stuparević, I. (2020). Non-coding RNAs as cell wall regulators in *Saccharomyces cerevisiae*. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(1), 15–25.

<https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1715340>

Ortiz-Merino, R. A., Varela, J. A., Coughlan, A. Y., Hoshida, H., da Silveira, W. B., Wilde, C., Kuijpers, N. G. A., Geertman, J.-M., Wolfe, K. H., & Morrissey, J. P. (2018). Ploidy Variation in

- Kluyveromyces marxianus* Separates Dairy and Non-dairy Isolates. *Frontiers in Genetics*, 0(MAR), 94. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2018.00094>
- Ostos Ortíz, O. L., Rosas Arango, S. M., & González Devia, J. L. (2019). Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. *Nova*, 17(31), 129–163. <https://doi.org/10.22490/24629448.3629>
- Otto, S., & Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, 34, 401–437. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.34.1.401>
- Pärnänen, P., Sorsa, T., Tervahartiala, T., & Nikula-Ijäs, P. (2024). Preparation and Purification of β -1,3-glucan-Linked *Candida glabrata* Cell Wall Proteases by Ion-Exchange Chromatography, Gel Filtration, and MDPF-Gelatin-Zymography Assay. *Bio-Protocol*, 14(6). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4958>
- Patra, P., Das, M., Kundu, P., & Ghosh, A. (2021). Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts. *Biotechnology Advances*, 47. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107695>
- Perpetuini, G., Tittarelli, F., Suzzi, G., & Tofalo, R. (2019). Cell Wall Surface Properties of *Kluyveromyces marxianus* Strains From Dairy-Products. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00079>
- Rajaei, N., Chiruvella, K. K., Lin, F., & Åström, S. U. (2014). Domesticated transposase Kat1 and its fossil imprints induce sexual differentiation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(43), 15491–15496. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1406027111>
- Rajkumar, A. S., & Morrissey, J. P. (2022). Protocols for marker-free gene knock-out and knock-down in *Kluyveromyces marxianus* using CRISPR/Cas9. *FEMS Yeast Research*, 22(1), 67. <https://doi.org/10.1093/FEMSYP/FOAB067>

- Rajaei, N., Chiruvella, K. K., Lin, F., & Åström, S. U. (2014). Domesticated transposase Kat1 and its fossil imprints induce sexual differentiation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(43), 15491–15496. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1406027111>
- Rajoka, M. I. (2007). Kinetic parameters and thermodynamic values of β -xylosidase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, 98(11), 2212–2219. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2006.08.029>
- Reina-Posso, D., & Gonzales-Zubiate, F. A. (2025). Expanding Horizons: The Untapped Potential of *Kluyveromyces marxianus* in Biotechnological Applications. *Fermentation* 2025, Vol. 11, Page 98, 11(2), 98. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION11020098>
- Ren, H., Yin, A., Wu, P., Zhou, H., Zhou, J., Yu, Y., & Lu, H. (2022). Establishment of a Cre-loxP System Based on a Leaky LAC4 Promoter and an Unstable panARS Element in *Kluyveromyces marxianus*. *Microorganisms*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061240>
- Ribeiro, O., K. Gombert, A., A. Teixeira, J., & Dominguez, L. (2007). Application of the Cre-loxP system for multiple gene disruption in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Biotechnology*, 131(1), 20–26. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2007.05.027>
- Ribeiro, R. A., Vitorino, M. v., Godinho, C. P., Bourbon-Melo, N., Robalo, T. T., Fernandes, F., Rodrigues, M. S., & Sá-Correia, I. (2021). Yeast adaptive response to acetic acid stress involves structural alterations and increased stiffness of the cell wall. *Scientific Reports*, 11(1), 12652. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-92069-3>
- Russell, C., Jawis', A., Yu', P.-L., & Mawson', J. (1993). Optimization of an electroporation procedure for *Kluyveromyces lactis* transformation. In *biotechnology techniques* (Vol. 7, Issue 7).

- Saitoh, S., Ishida, S., Onishi, T., Tokuhira, K., Nagamori, E., Kitamoto, K., & H, T. (2005). Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2789–2792.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2789-2792.2005>
- Sánchez, M., Iglesias, F. J., Santamaría, C., & Domínguez, A. (1993). Transformation of *Kluyveromyces lactis* by Electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 2087–2092. <https://doi.org/10.1128/aem.59.7.2087-2092.1993>
- Sanchez-Garcia, L., Martín, L., Mangués, R., Ferrer-Miralles, N., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2016). Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update. *Microbial Cell Factories*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12934-016-0437-3>
- Simões, T., Teixeira, M. C., Fernandes, A. R., & Sá-Correia, I. (2003). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, mediated by Msn2p- and Msn4p-regulated genes: Important role of SPI1. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4019–4028. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4019-4028.2003>
- Singh, R. S., Sooch, B. S., & Puri, M. (2007). Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Bioresource Technology*, 98(13), 2518–2525.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2006.09.011>
- Sticklen, M. B. (2008). *Plant Cells, Chloroplasts, Cell Walls*. Nature Publishing Group.
<https://www.nature.com/scitable/topicpage/plant-cells-chloroplasts-and-cell-walls-14053956/>

- Ström, S. U. A. °, & Rine, J. (1998). Theme and Variation Among Silencing Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). *MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11* (11).
- Todd, R. T., Forche, A., & Selmecki, A. (2017). Ploidy Variation in Fungi – Polyploidy, Aneuploidy, and Genome Evolution. *Microbiology Spectrum*, 5(4).
<https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0051-2016>
- Varela, J. A., Puricelli, M., Ortiz-Merino, R. A., Giacomobono, R., Braun-Galleani, S., Wolfe, K. H., & Morrissey, J. P. (2019). Origin of Lactose Fermentation in *Kluyveromyces lactis* by Interspecies Transfer of a Neo-functionalized Gene Cluster during Domestication. *Current Biology*, 29(24), 4284-4290.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.10.044>
- Wang, P. (2021). Genetic Transformation in *Cryptococcus* Species. *Journal of Fungi* 2021, Vol. 7, Page 56, 7(1), 56. <https://doi.org/10.3390/JOF7010056>
- Wolfe, K. H., & Butler, G. (2022). Mating-Type Switching in Budding Yeasts, from Flip/Flop Inversion to Cassette Mechanisms. <https://journals.asm.org/journal/membr>
- Zhou, H. X., Xu, J. L., Chi, Z., Liu, G. L., & Chi, Z. M. (2013). β -Galactosidase over-production by a mig1 mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. *Biochemical Engineering Journal*, 76, 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2013.04.010>

IX. Anexos

Anexo I. Región ITS1-5.8 en candidatas transformantes.

Se llevó a cabo una PCR de la región ITS1-5.8 de las candidatas transformantes de *K. marxianus*. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis y los resultados confirman que todas las regiones amplifican para un mismo tamaño (Lappe-Oliveras et al., 2023).

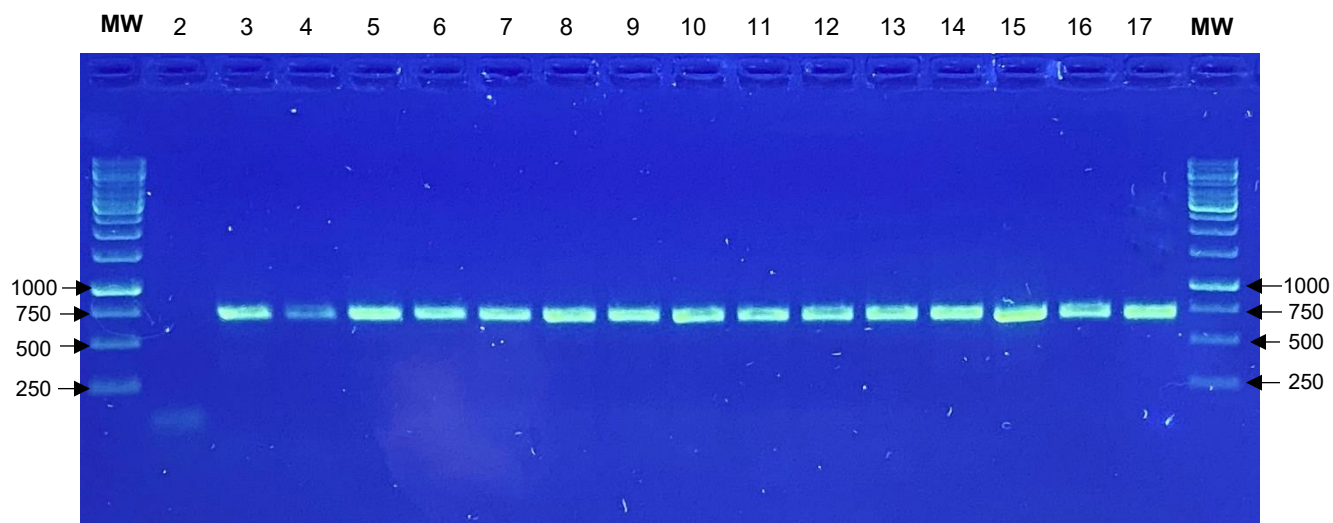


Figura 49. Amplificación por PCR de la región ITS1-5.8 de candidatas transformantes de *K. marxianus*. 2) Control negativo, 3) ADN_g CBS6556, 4) Colonia 2, 5) Colonia 3, 6) ADN_g CBS 6556, 7) Colonia 1, 8) Colonia 2, 9) Colonia 7, 10) ADN_g Kmx 16, 11) Colonia 3, 12) Colonia 4, 13) Colonia 11, 14) ADN_g Kmx 24, 15) Colonia 1, 16) Colonia 2, 17) Colonia 7.

Anexo II. Microsatélites en candidatas transformantes.

Para evaluar la diversidad genética entre los aislados de *K. marxianus*, se realizó la huella genética con el microsatélite (GTG)₅. Los patrones observados fueron sencillo y constaron de tres a cinco bandas con tamaños entre 500 y 2000 pb (Lappe-Oliveras et al., 2023) .

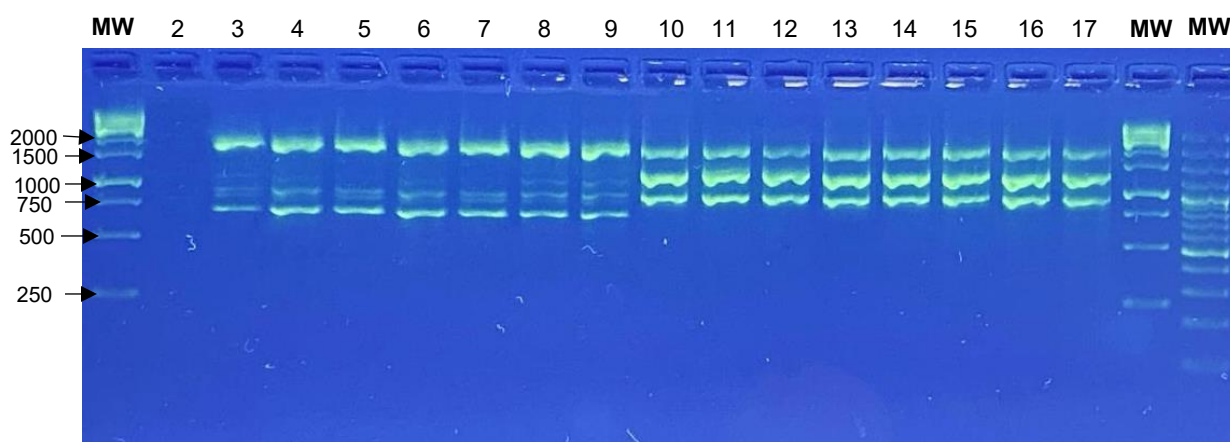


Figura 50. Huella digital por PCR de los aislados de *K. marxianus* obtenidos con el cebador microsatélite (GTG)₅. 2) Control negativo, 3) ADN_g CBS6556, 4) Colonia 2, 5) Colonia 3, 6) ADN_g CBS 6556, 7) Colonia 1, 8) Colonia 2, 9) Colonia 7, 10) ADN_g Kmx 16, 11) Colonia 3, 12) Colonia 4, 13) Colonia 11, 14) ADN_g Kmx 24, 15) Colonia 1, 16) Colonia 2, 17) Colonia 7.

Anexo III. Crecimiento de cepas en presencia de CFW a distintas temperaturas.

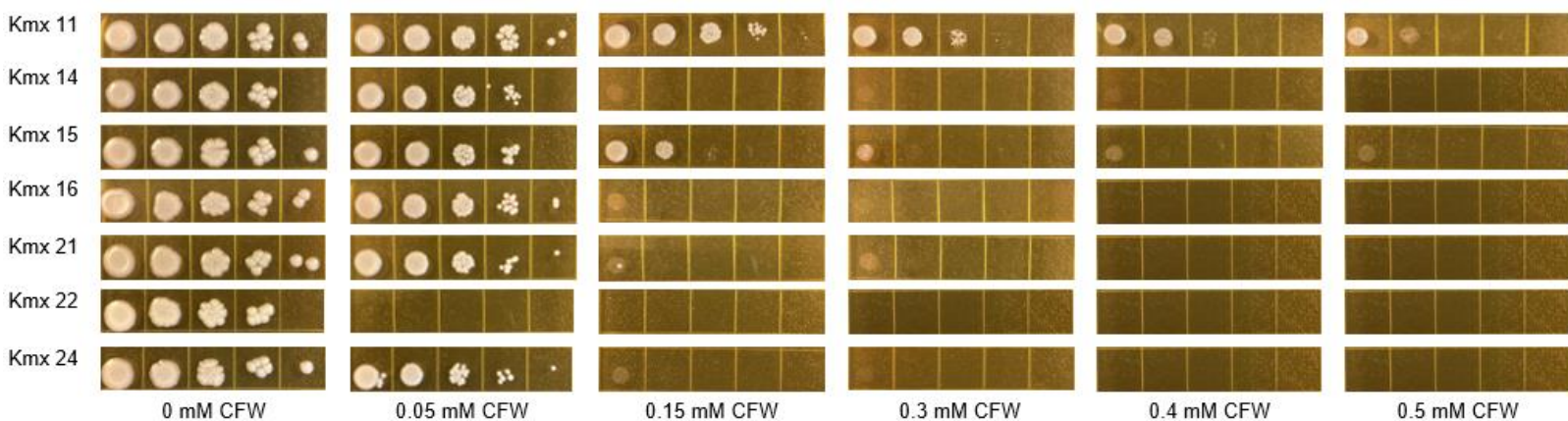


Figura 51. Crecimiento de cepas autóctonas de *K. marxianus* en presencia de CFW [0.05 mM-0.5 mM] a 30°C.

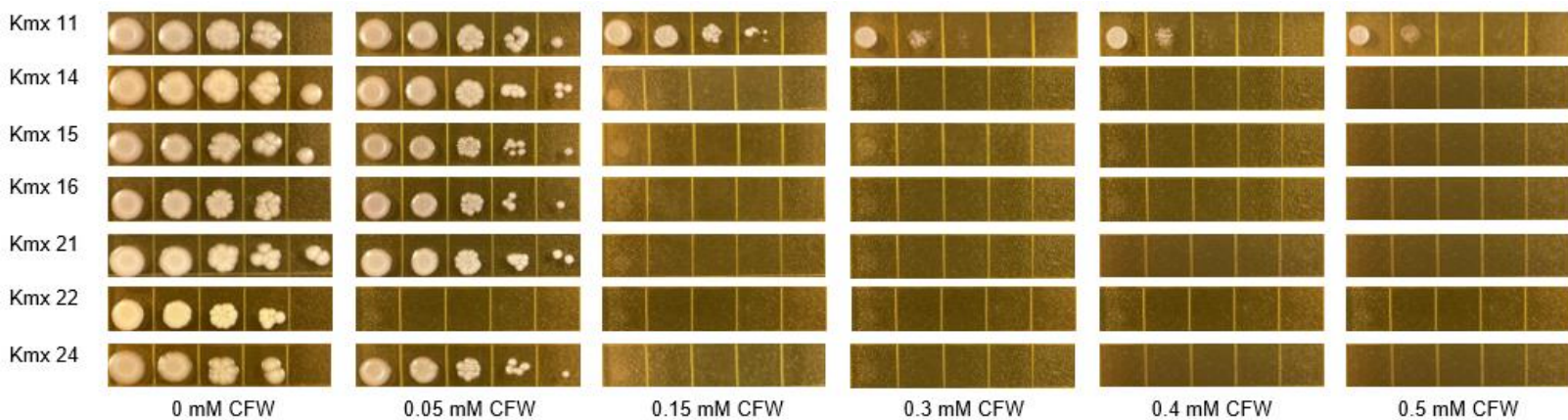


Figura 52. Crecimiento de cepas autóctonas de *K. marxianus* en presencia de CFW [0.05 mM-0.5 mM] a 37°C.

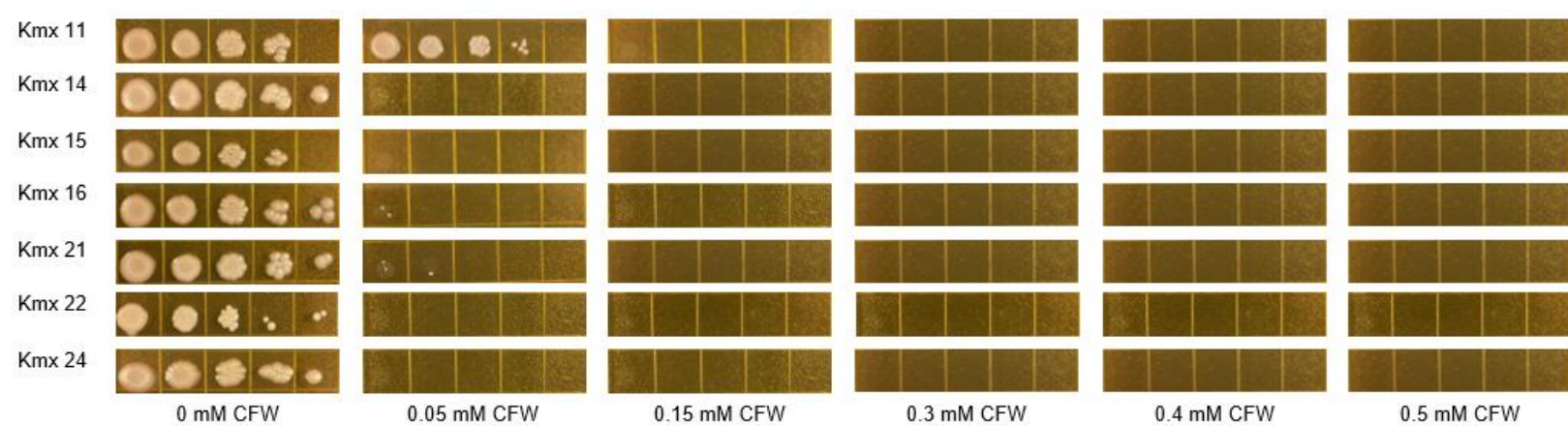


Figura 53. Crecimiento de cepas autóctonas de *K. marxianus* en presencia de CFW [0.05 mM-0.5 mM] a 42°C.

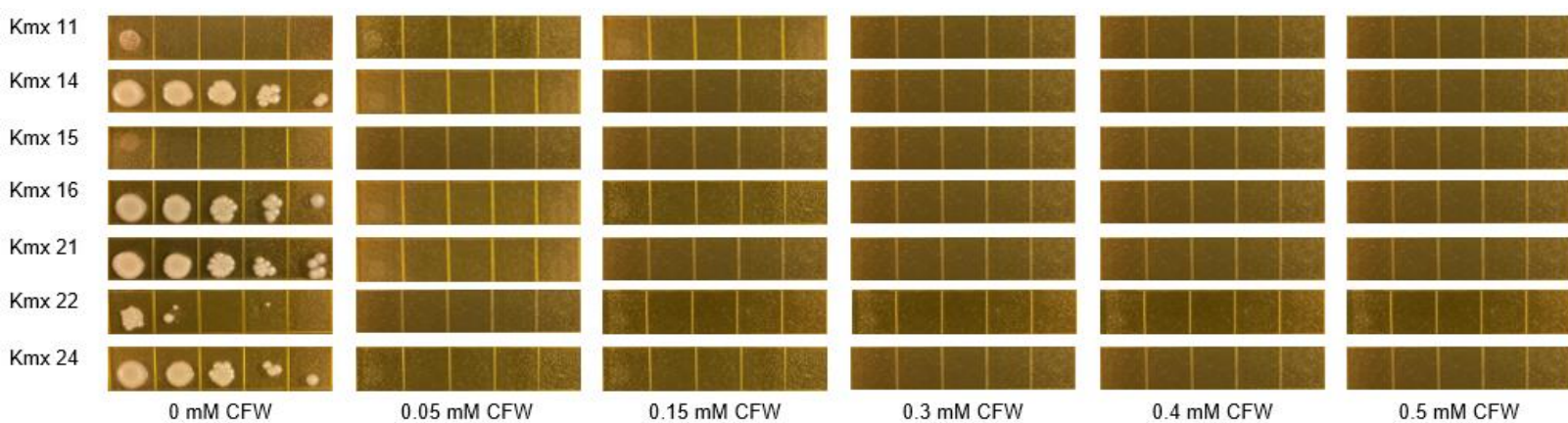


Figura 54. Crecimiento de cepas autóctonas de *K. marxianus* en presencia de CFW [0.05 mM-0.5 mM] a 45°C.

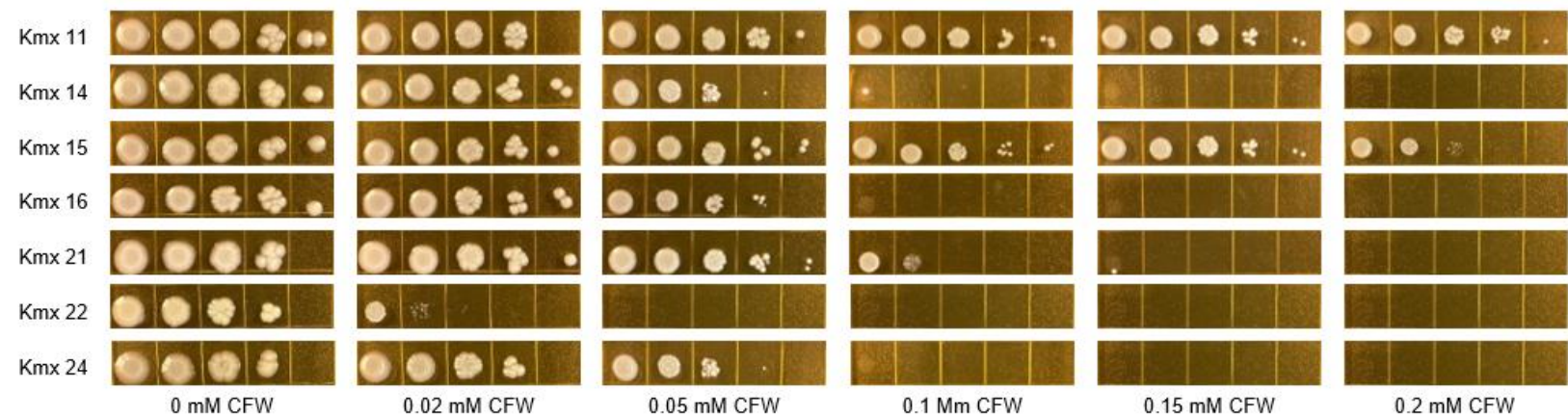


Figura 55. Crecimiento de cepas autóctonas de *K. marxianus* en presencia de CFW [0.02 mM-0.2 mM] a 30°C.

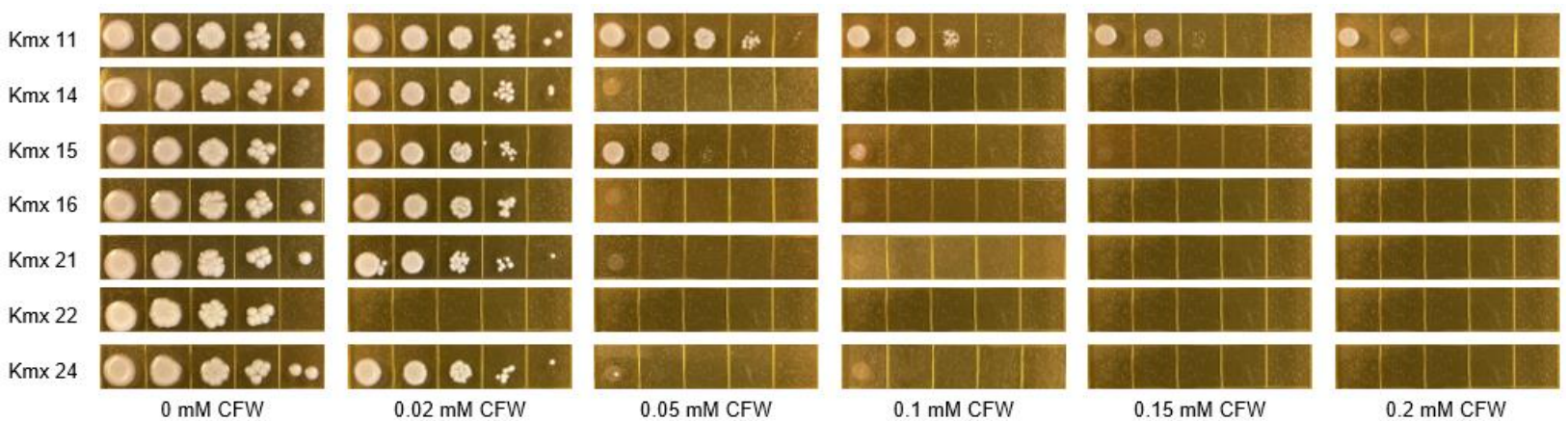


Figura 56. Crecimiento de cepas autóctonas de *K. marxianus* en presencia de CFW [0.02 mM-0.2 mM] a 37°C.

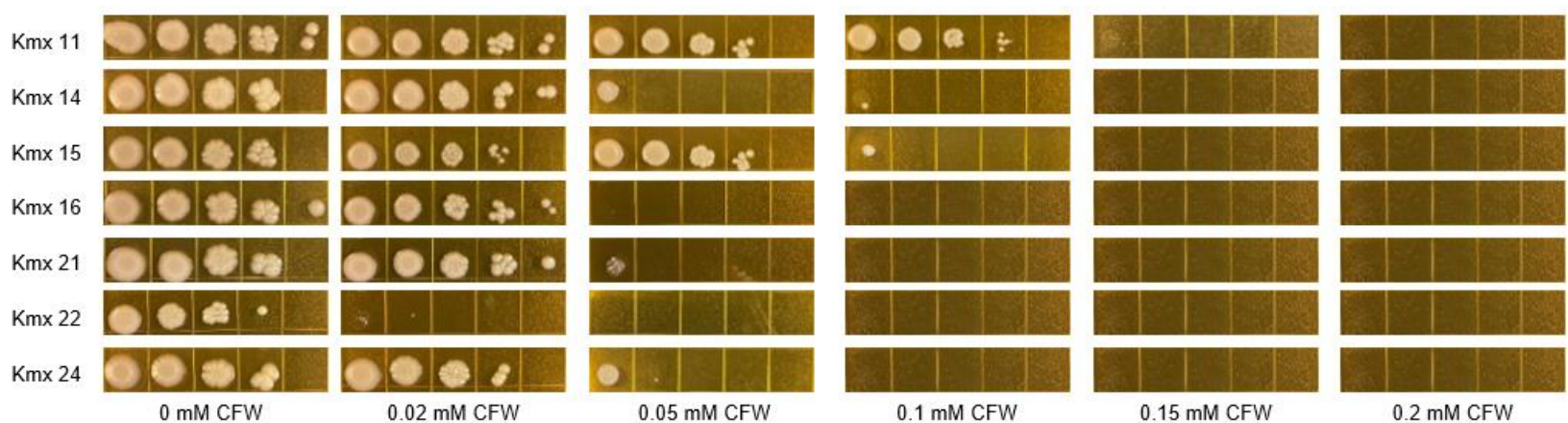


Figura 57. Crecimiento de cepas autóctonas de *K. marxianus* en presencia de CFW [0.02 mM-0.2 mM] a 42°C.

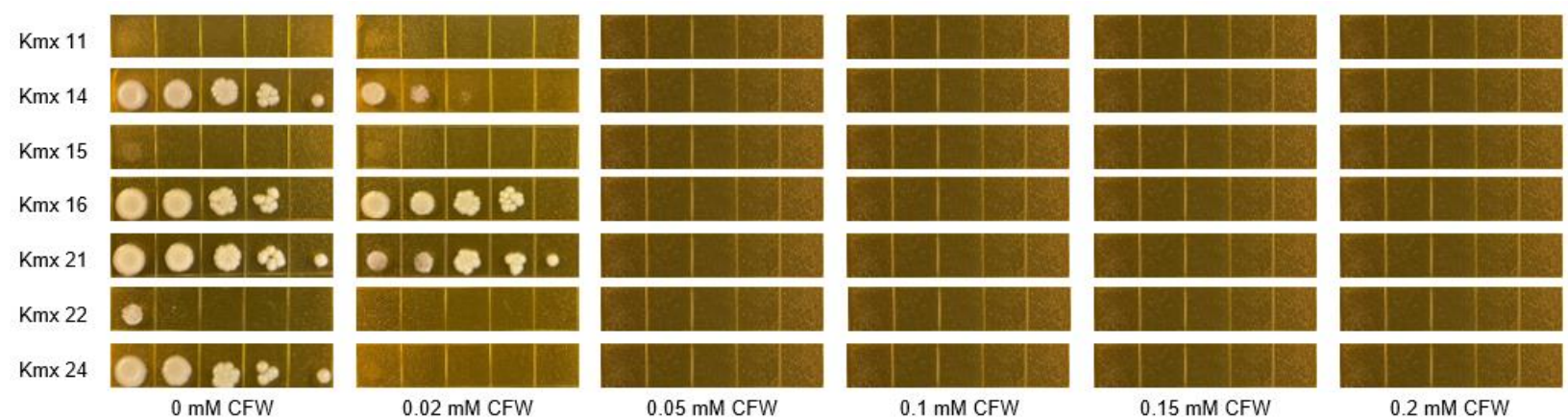
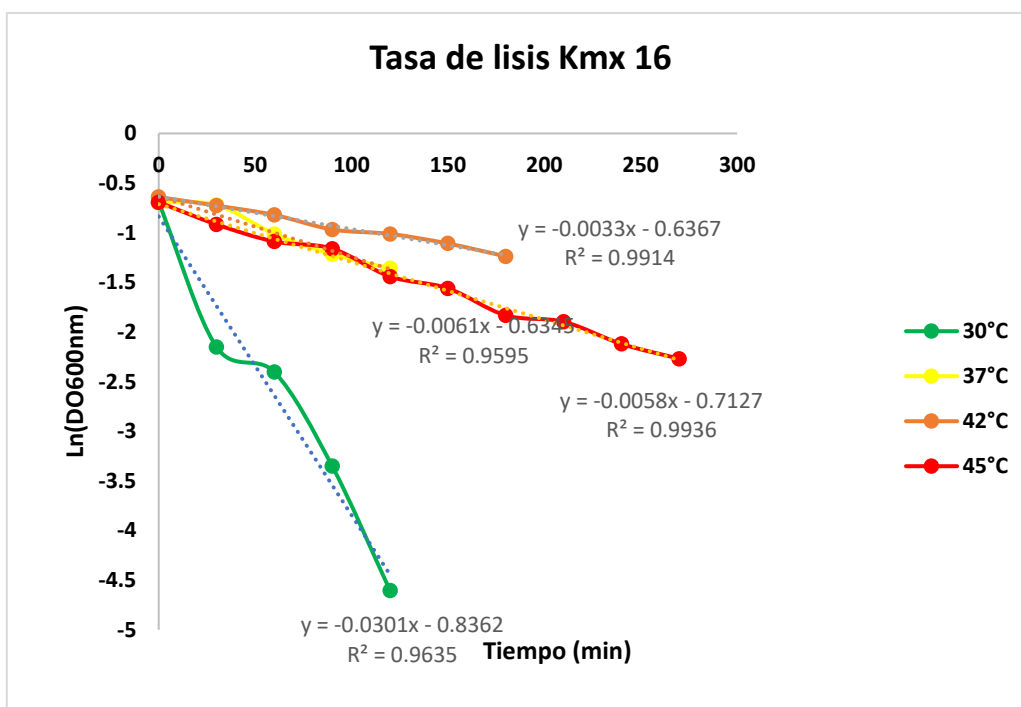
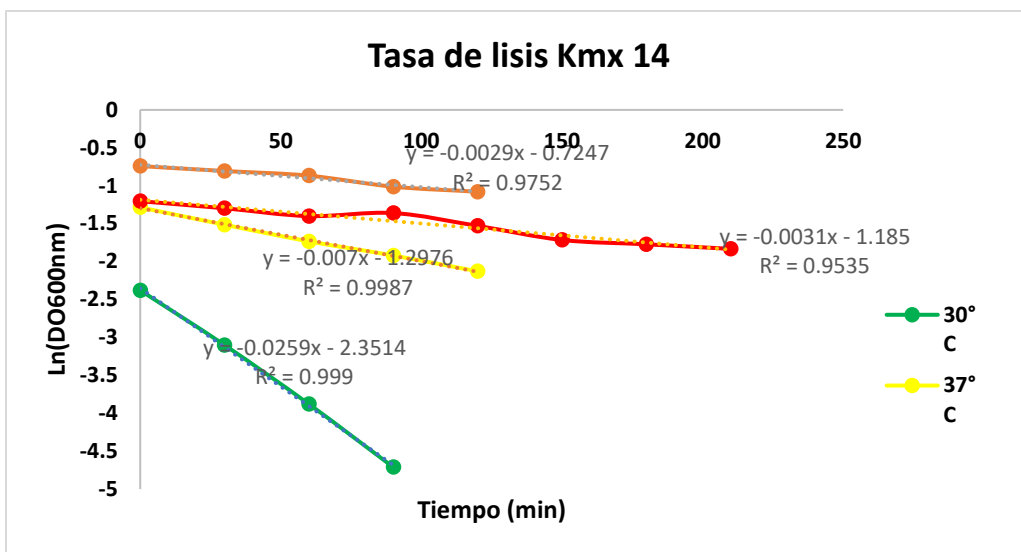
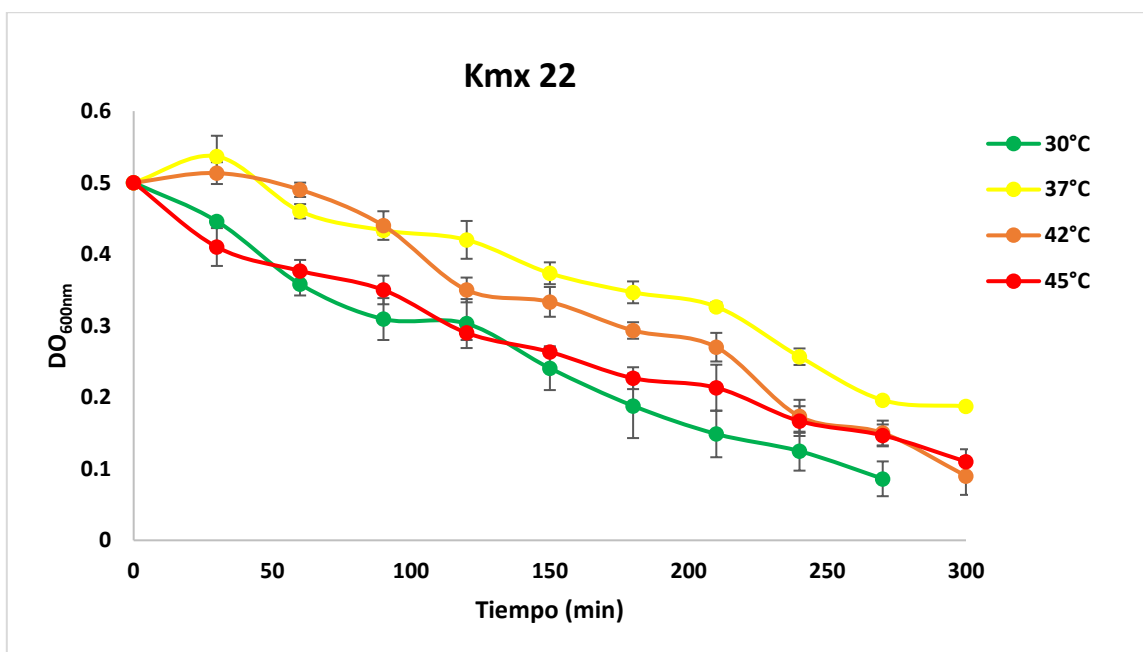
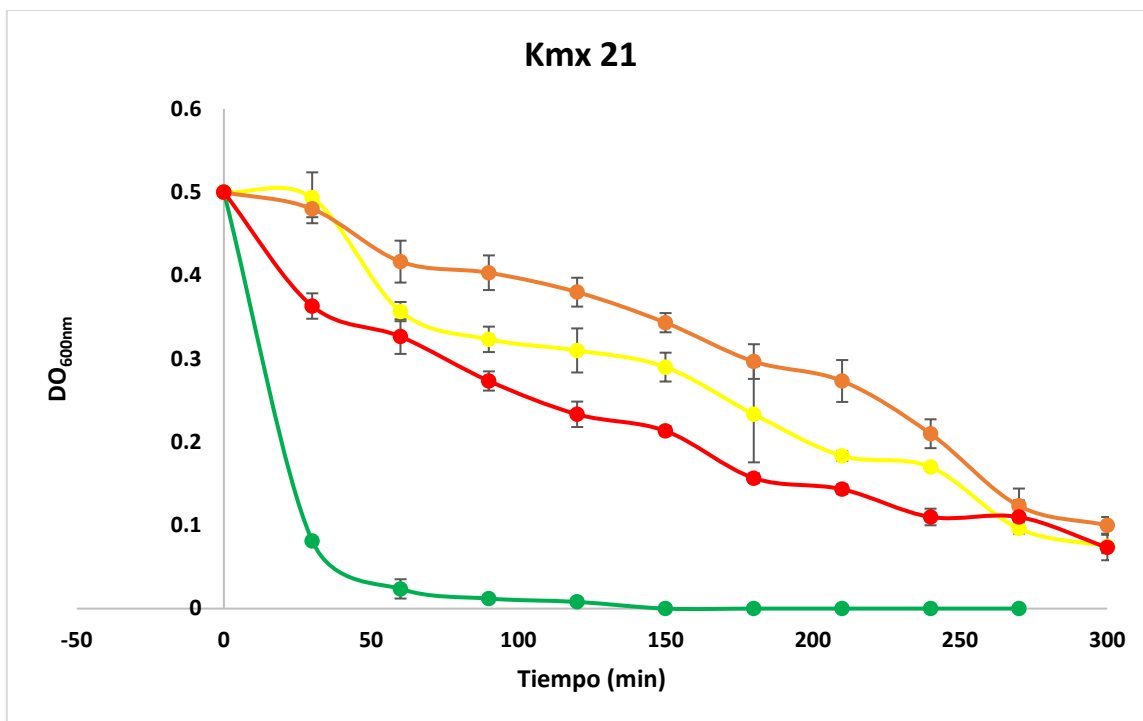
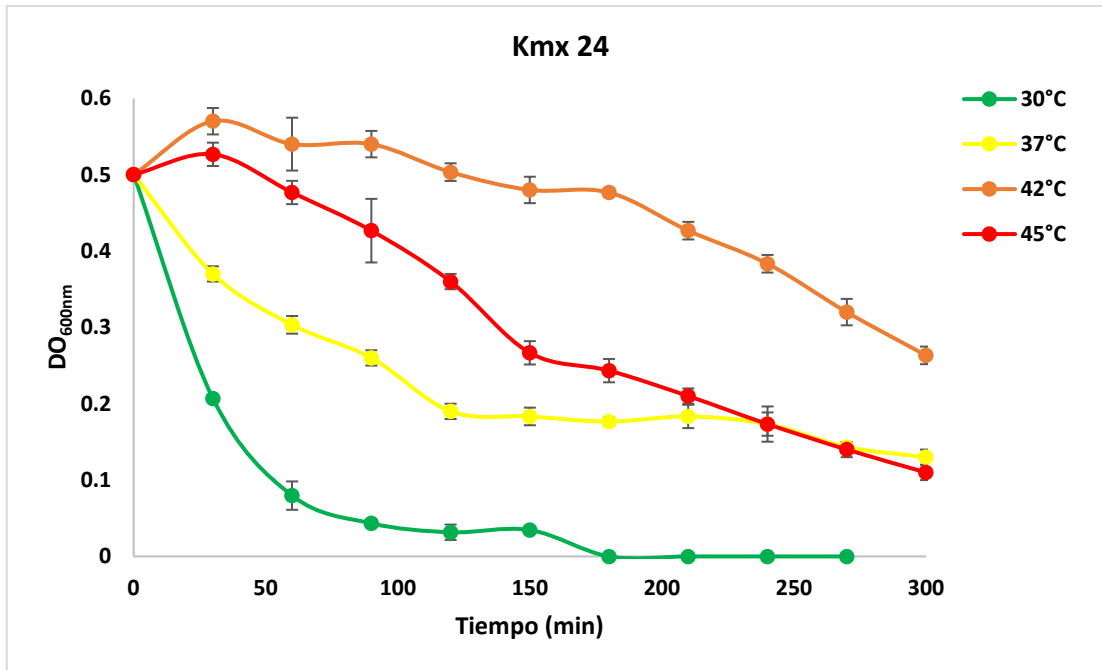


Figura 58. Crecimiento de cepas autóctonas de *K. marxianus* en presencia de CFW [0.02 mM-0.2 mM] a 45°C.







Anexo IV. Ubicación de genes de pared en borrador del genoma de cepas autóctonas.

Cepas	Gene	Ubicación
Kmx 14	FKS1	Contig 16
	BGL2	Contig 6
	CHS3	Contig 5
	CRH1	Contig 14
	GAS1	Contig 6
Kmx 15	FKS1	Contig 5
	BGL2	Contig 10
	CHS3	Contig 2
	CRH1	Contig 3
	GAS1	Contig 10
Kmx 16	FKS1	Contig 11
	BGL2	Contig 5
	CHS3	Contig 1
	CRH1	Contig 2
	GAS1	Contig 5
Kmx 22	FKS1	Contig 3
	BGL2	Contig 6
	CHS3	Contig 1
	CRH1	Contig 4
	GAS1	Contig 6
Kmx 24	FKS1	Contig 5
	BGL2	Contig 7
	CHS3	Contig 2
	CRH1	Contig 4
	GAS1	Contig 7

X. Semblanza de Sara D. Sánchez.

Ingeniera bióloga por la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa. Proyecto terminal “Estudios preliminares para el desarrollo de herramientas de ingeniería genética de levaduras termotolerantes *Kluyveromyces marxianus* autóctonas para su uso como biofábricas celulares”. Y servicio social en “Desarrollo y aplicación de herramientas de biología molecular para la bacteria *Escherichia coli* y levaduras”, ambos realizados en el laboratorio de Biotecnología de la UAM-C.

Mi investigación se ha centrado en la caracterización fisiológica y molecular de una colección de levaduras autóctonas *K. marxianus*. A continuación, se muestra la publicación de un artículo de la cual soy co-autora y en la mismo se presentaron algunos resultados derivados de mi proyecto de investigación:

Lappe-Oliveras, P., Avitia, M., Sánchez-Robledo, Sara. D., Castillo-Plata, A. K., Pedraza, L., Baquerizo, G., & Borgne, S. Le. (2023). Genotypic and Phenotypic Diversity of *Kluyveromyces marxianus* Isolates Obtained from the Elaboration Process of Two Traditional Mexican Alcoholic Beverages Derived from Agave: Pulque and Henequen (Agave fourcroydes) Mezcal. *Journal of Fungi*, 9(8), 1–19.
<https://doi.org/10.3390/jof9080795>