

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



Escuela Superior de Apan

TESIS DE LICENCIATURA

Caracterización de promotores inducibles en *Xanthophyllomyces dendrorhous* para su aplicación en sistemas de expresión regulables orientados a la producción de taxantina.

Para obtener el título de
Licenciada en Ingeniería en Biociencias

P R E S E N T A
Alejandra Sánchez Licona

Directores de Tesis
Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
Dr. Pablo Antonio López Pérez

Apan, Hidalgo., México, 18 de noviembre del 2025



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Escuela Superior de Apan

Campus Apan

Número de control: ESAP-027/2025

Asunto: Autorización de impresión de tesis

Alejandra Sánchez Licona

P.D.L.I.B.C.

P R E S E N T E

Por este medio le comunico que, el jurado asignado a la pasante de la Licenciatura en Ingeniería en Biociencias Alejandra Sánchez Licona (356312), a quienes les presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título “Caracterización de promotores inducibles en *Xanthophyllomyces dendrorhous* para su aplicación en sistemas de expresión regulables orientados a la producción de astaxantina”, después de la revisión ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dr. Aldo Christiaan Jardínez Vera

SECRETARIO: Dr. Alberto Navarrete Peón

PRIMER VOCAL: Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

SEGUNDO VOCAL: Dr. Pablo Antonio López Pérez

TERCER VOCAL: M. en C. Oscar Ulises García Flores

SUPLENTE: Ing. Ma. Rafaela Mohedano Juárez

ATENTAMENTE
“Amor, Orden y Progreso”
Chimalpa, Apan, Hgo., México a 18 de noviembre de 2025.

Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros
Coordinadora de Ingeniería en Biociencias



Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43900
Teléfono: 7717172000 Ext. 50901
esap@uaeh.edu.mx

“Amor, Orden y Progreso”

Índice

Resumen.....	8
Abstract.....	9
Abreviaturas y Definiciones	10
Capítulo 1.....	14
Introducción	14
Capítulo 2 Marco Teórico.....	17
2.1 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	18
2.1.1 Características generales.....	18
2.1.2 Fuentes de carbono	21
2.2 Regulación de la expresión génica	22
2.3 Promotores.....	24
2.3.1 Tipos de promotores	26
2.3.2 Promotores inducibles por carbohidratos	28
2.3.3 Promotores inducibles por fuentes de carbono no fermentables	29
2.3.4 Promotores que se inducen con otros estímulos	31
Capítulo 3.....	32
3.1 Justificación	33
3.2 Hipótesis	33
3.3 Objetivo General	33
3.4 Objetivos Particulares.....	33
3.5 Metodología.....	34
Capítulo 4.....	36
Materiales y Métodos.....	36
4.1 Material biológico	37
4.1.1Cepas y condiciones de cultivo	37
4.2 Plásmidos	37
4.3 Extracción y análisis de ácidos nucleicos	38
4.3.1 Extracción de DNA genómico de levadura	38
4.3.3 Purificación de fragmentos de gel de agarosa	38
4.4 Reacción en cadena de la polimerasa	38
4.4.1 Purificación de productos de PCR.....	38

4.4.2 Análisis de ácidos nucleicos	39
4.5 Clonación y subclonación de módulos	39
4.6 Transformación.....	40
4.6.1 Transformación de <i>E. coli</i>	40
4.6.2 Transformación de <i>X. dendrorhous</i>	40
4.7 Cracking.....	41
4.8 Digestión enzimática	41
4.9 Diálisis	41
4.10 Precipitación por etanol.....	42
Capítulo 5.....	43
Resultados y Discusiones.....	43
5.1 Identificación de secuencias promotoras.....	44
5.2 Diseño del plásmido modular	46
5.3 Diseño de oligos.....	47
5.4 Construcción del plásmido modular.....	49
5.5 Amplificación de secuencias promotoras	60
5.6 Clonación de secuencias promotoras al plásmido modular	62
5.6.1 Clonación de los promotores ICL, XDH, TCP-1-ALPHA y GPD.....	62
5.6.2 Clonación del promotor LAD.....	66
5.6.3 Clonación de los promotores GUT1 y AGP	67
5.7 Transformación de <i>X. dendrorhous</i>	69
Capítulo 6 Conclusión y perspectivas.....	73
Bibliografía	76

Listado de Figuras

Figura 1. Clasificación taxonómica de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	19
Figura 2. Ruta de la biosíntesis de astaxantina en <i>X. dendrorhous</i> (Barredo et al., 2017).....	21
Figura 3. Estructura eucariótica del gen y unidades de transcripción.....	25
Figura 4. Estrategia experimental.....	35
Figura 5. Final de precipitación.....	42
Figura 6. Estructura del vector pXDrDNA YEFP V2.....	46
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR: amplificación del gen YEFP y del terminador GDH.....	49
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR recombinante para la unión del gen YEFP con el terminador GDH.....	50
Figura 9. Análisis electroforético por cracking de colonias transformadas con pJET 1.2/YEFP-GDH.....	51
Figura 10. Análisis por digestión enzimática de pJET 1.2 con el inserto YEFP-GDH.....	53
Figura 11. Análisis electroforético del primer paso en la polimerización azarosa de fragmentos (PAF).....	55
Figura 12. Análisis electroforético de cracking posterior al PAF.....	56
Figura 13. Análisis electroforético de la linealización del plásmido con PstI.....	57
Figura 14. Digestión múltiple del plásmido recombinante.....	58
Figura 15. Mapa esquemático del vector de pXDrDNA YEFP V2.....	59
Figura 16. Alineamiento entre el plásmido diseñado y el secuenciado.....	60
Figura 17. Análisis electroforético de la amplificación de secuencias promotoras.....	61
Figura 18. Digestión de las clonaciones de promotores.....	63
Figura 19. Clonación del promotor del gen isocitrato liasa (ICL1).....	65
Figura 20. Análisis electroforético de la digestión del plásmido con el promotor LAD.....	66
Figura 21. Análisis electroforético de las digestiones de las construcciones con los promotores GUT y AGP.....	68
Figura 22. Verificación por PCR de las secuencias promotoras clonadas.....	69

Listas de Tablas

Tabla 1. Cepas utilizadas.....	37
Tabla 2. Plásmidos empleados.....	37
Tabla 3. Genes inducibles seleccionados	45
Tabla 4. Iniciadores diseñados.....	48
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria.....	70

Agradecimientos

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

Mi agradecimiento es profundo por recibirme en el laboratorio, por brindarme la confianza y las herramientas necesarias para realizar este proyecto tan importante. El impacto que género en mi vida se ve reflejado en este logro académico y en mi ambición por el aprendizaje.

Dr. Pablo Antonio López Pérez

Desde las primeras clases que tuve con usted sentí una gran admiración por la labor que realiza, por sus conocimientos infinitos sobre los temas explicados, pero sobre todo por la paciencia con la cual nos atendía sesión con sesión. Desde un principio sabía que quería trabajar con usted y le agradezco que me lo haya permitido, además de que me ha guiado por este camino del aprendizaje y por brindarme un espacio en el cual descubriría temas que me encantaría. Pero lo más importante es que usted siempre confió en mí, aunque a veces yo no lo hacía, es un gran mentor y guía.

M. en C. Oscar Ulises García Flores

Ninguna palabra sería suficiente para expresar la gratitud que le tengo por guiarme en cada paso de este proyecto, por enseñarme pacientemente y por transmitirme ese amor al descubrimiento. Nunca me presionó y al contrario me apoyó aun cuando las cosas no resultaban, los pequeños consejos y tips los tengo muy presentes. Es imprescindible mencionar que si su mentoría no lo hubiera logrado.

Al comité revisor

Dra. Zoila Rosa Flores Bustamante

Gracias por dedicar su tiempo y esfuerzo para transmitirme lo necesario para culminar este proyecto.

Laboratorio de Metabolismo Secundario de Microorganismos

Gracias por la recepción tan amena que tienen con cada uno de los estudiantes, Dra. Zoila le agradezco su amabilidad y el ser parte de esta gran oportunidad brindada para desarrollar este proyecto, Q. Fernando su alegría hacia que cada día en la investigación fuera llevadero además de transmitir conocimiento invaluable por último Dra. Lory aunque lo compartido fue menos es igual de importante que el resto, la paciencia que tenías y la amabilidad son cosas inolvidables.

CINVESTAV

Mtra. Beatriz Irene Arroyo Sánchez sin duda marcaste un hito muy importante en mi estancia en dicho lugar, tu alegría y tus enseñanzas fueron parte fundamental. Mtro. Gustavo Jesús Guzmán Melgarejo con tu compañía y el permitirme aprender de ti es algo por lo cual te agradezco, tu valentía le dieron un impulso muy importante en mi estancia y en mi aprendizaje. Mtro. José Luis Sánchez me brindo motivación, pero sobre todo pequeñas enseñanzas fundamentales para el desarrollo de este proyecto.

A mis padres

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a ustedes, quienes han sido un pilar fundamental en este proceso. Su amor incondicional, paciencia y apoyo constante me han dado la fuerza necesaria para alcanzar este logro. Agradezco su confianza en mí, sus enseñanzas y, sobre todo, su ejemplo de perseverancia y dedicación. Sin su constante apoyo, tanto emocional como material, este proyecto no hubiera sido posible. Este trabajo es el reflejo de todo lo que he aprendido de ustedes, y con todo mi corazón les dedico este logro.

A mi familia

Les doy las gracias a mis hermanas y hermano Brenda, Anayeli, Irene, Mauricio quienes siempre han estado a mi lado durante este proceso. Su amor, apoyo y motivación inquebrantables me han dado la fuerza para continuar incluso en los momentos más desafiantes. Gracias por su paciencia, por las risas compartidas en los momentos difíciles y por ser mi fuente constante de inspiración. Sin su cariño y comprensión, este logro no habría sido posible. A ustedes, les debo gran parte de este éxito. Sin duda alguna también mis sobrinas Itzel, Mildred, Pamela y sobrinos Fernando, Enrique muchas gracias quienes con su alegría, ternura y entusiasmo han sido una fuente constante de energía y motivación a lo largo de este proceso. Gracias por iluminar mis días con su sonrisa y por recordarme la importancia de disfrutar los pequeños momentos. Aunque no siempre entendieron el esfuerzo que implica este trabajo, su apoyo incondicional me dio fuerzas para seguir adelante.

Mi persona especial

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a ti, por tu amor, apoyo incondicional y paciencia a lo largo de este proceso. Tu comprensión y aliento han sido fundamentales para superar los momentos de duda y cansancio. Gracias por estar siempre a mi lado, celebrando mis pequeños logros y brindándome fuerzas cuando más lo necesité. Este trabajo es también el resultado de tu apoyo constante, de tu confianza en mí y de todo lo que me has enseñado. No tengo palabras suficientes para agradecerte por ser mi compañero en cada paso de este camino.

A mis amigos, compañeros y maestros

A todas las personas que me han acompañado en este camino, gracias totales...

Resumen

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomiceta capaz de fermentar azúcares y sintetizar carotenoides, especialmente astaxantina, un compuesto con propiedades antioxidantes. Para la sobreproducción de este pigmento se han generado mutantes mediante agentes químicos y físicos; sin embargo, presentan desventajas, como un menor tamaño en comparación a la cepa nativa o dificultades para asimilar algunos nutrientes.

En este trabajo se analizaron una serie de secuencias putativamente promotoras utilizando recursos bioinformáticos. A partir de oligonucleótidos específicos, se amplificaron fragmentos de ADN nativo de la levadura y se clonaron a un plásmido modular. Este vector permitió evaluar la expresión y regulación génica a través de una fermentación y lectura en placas, utilizando como marcador la expresión del gen de proteína fluorescente amarilla (YFP).

Se clonaron seis secuencias promotoras y una adicional como control positivo, lo cual permitió validar la construcción del plásmido modular a través de su secuenciación y ampliación de las secuencias promotoras iniciales.

Así, este proyecto se enfocó en la identificación de promotores inducibles por estímulos específicos, con el objetivo de ejercer un control más preciso sobre la expresión génica. Esto contribuiría a modular procesos metabólicos involucrados en el aprovechamiento de nutrientes como fuentes de carbono no fermentables (glicerol o etanol), amonio, ciertos aminoácidos, entre otros compuestos clave en la producción de astaxantina.

Abstract

Xanthophyllomyces dendrorhous is a basidiomycete yeast capable of fermenting sugars and synthesizing carotenoids, especially astaxanthin, a compound with antioxidant properties. Mutants have been generated to overproduce this pigment using chemical and physical agents; however, they present disadvantages, such as a smaller size compared to the native strain or difficulties assimilating some nutrients.

In this work, a series of putative promoter sequences were analyzed using bioinformatics resources. From specific oligonucleotides, native yeast DNA fragments were amplified and cloned into a modular plasmid. This vector allowed the evaluation of gene expression and regulation through fermentation and plate reading, using the expression of the yellow fluorescent protein (YFP) gene as a marker.

Six promoter sequences and an additional one as a positive control were cloned, which allowed the construction of the modular plasmid to be validated through sequencing and amplification of the initial promoter sequences. Thus, this project focused on identifying promoters inducible by specific stimuli, with the goal of exerting more precise control over gene expression. This would contribute to modulating metabolic processes involved in the utilization of nutrients such as non-fermentable carbon sources (glycerol or ethanol), ammonium, certain amino acids, and other key compounds in astaxanthin production.

Abreviaturas y Definiciones

Ácido desoxirribonucleico (DNA):

Molécula que transporta información genética para el desarrollo y funcionamiento de un organismo, compuesto por dos cadenas que se enrollan entre sí (National Human Genome Research Institute, 2025a).

Ácido desoxirribonucleico recombinante (DNAr):

Molécula artificial creada por la integración de segmentos de interés de dos o más organismos (Gelambi, 2023).

Ácido ribonucleico (RNA):

Macromolécula de tipo orgánica, perteneciente al grupo de los ácidos nucleicos y formado por una única cadena (National Human Genome Research Institute, 2025b).

Ácido ribonucleico polimerasa (RNA pol):

Enzima de múltiples subunidades que cataliza el proceso de transcripción donde se sintetiza un polímero de ARN a partir de una plantilla de ADN (Mira, 2021).

Ácido ribonucleico mensajero (RNAm):

Su función es transportar la información proteica del DNA del núcleo hasta el citoplasma de la célula (National Human Genome Research Institute, 2025c).

Alfa glucosidasa (AGP):

Catalizan la ruptura de carbohidratos complejos y tienen mayor actividad hidrolizando monómeros (Alemcha, s. f.).

Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GPD):

Participa en la glucolisis, descomponiendo glucosa que permite obtener energía y moléculas de carbono (AcademiaLab, s.f.).

Glicerol quinasa (*GUTI*):

Gen que codifica el glicerol quinasa, este es necesario para el crecimiento en glicerol (Pavlik et al., 1993)

Glutamato deshidrogenasa (*GDH*):

Enzima que cataliza la desaminación oxidativa del glutamato para formar α -cetoglutarato y amonio (Clínica Universidad de Navarra, s.f.).

Isocitrato liasa (*ICL1*):

Parte fundamental del ciclo del glioxilato su expresión codifica a la isocitratolasa (Pilar & De, 1996).

L-arabinitol 4-deshidrogenasa (*LAD*):

Participa en la vía catabólica de L-arabinosa, catalizando la conversión de L-arabinitol en L-xilulosa (Bae et al., 2010).

Micro ácido ribonucleico (miARN):

Pequeñas moléculas de 20-25 nucleótidos no codificantes que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional (Giner et al., 2016).

National Center for Biotechnology Information (NCBI):

Portal que promueve la salud y la ciencia brindando acceso gratuito a la información biomédica y genómica (NCBI, s.f.).

Polimerización azarosa de fragmentos (PAF):

Proceso de agrupación que consiste en una serie de digestiones y ligaciones para la obtención de un plásmido específico (García, 2022).

Proteína fluorescente amarilla mejorada (*YEFP*):

Proteína de fusión, después la transcripción y traducción del plásmido en los huéspedes, las señales de localización nuclear son responsables del transporte de la proteína fluorescente quimera al núcleo celular (Enhanced Yellow Fluorescent Protein (*EYFP*) Nuclear Localization, s. f.).

Proteína verde fluorescente (*GFP*):

Proteína originalmente aislada de las medusas, utilizado como marcador molecular fluorescente al ser expuesto con luz ultravioleta (Shaner et al., 2004).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Técnica de laboratorio empleada para amplificar secuencias de DNA, con esta es posible producir millones de copias de la secuencia en estudio en pocas horas (Rojas et al., s. f.).

Subunidad alfa de la proteína del complejo T (*TCP-1-ALPHA*):

Complejo que contiene chaperonina, se ha evaluado su función con el descenso de la temperatura (Ursic & Culbertson, 1991).

Trifosfato de desoxirribonucleótido (dNTP):

Componente que permite la replicación del DNA, por medio de la amplificación de secuencias diana (Wong, 2024).

Xilitol deshidrogenasa (*XDH*):

Enzima que participa en el metabolismo de la xilosa dentro de este oxida el xilitol a xilulosa (De la Riva et al., 2015).

Basidiomiceto:

Grupo de hongos con más de treinta mil especies, su cualidad principal es la presencia de basidios y su superioridad debido a la complejidad morfológica que presentan (Ramírez, 2013).

Ergosterol:

Componente esencial de las membranas celulares eucariotas (Jordá & Puig, 2020).

in silico:

Es una expresión que significa “hecho por computador o vía simulación computacional”. Describe al modelado, simulación y visualización de procesos biológicos, físicos y químicos mediante computadoras (Rim., 2020).

Oligos:

Son hebras cortas individuales de DNA o RNA fabricadas mediante una síntesis química en fase sólida agregando uno a uno los ácidos nucleicos correspondientes (Staff, 2019).

Polímero:

También conocido como biopolímero formado de distintas unidades químicas que se repiten en orden diferentes (Puig, 2022).

Promotor:

Región de ADN próxima a un gen, en la que proteínas de gran importancia se unen para comenzar con la transcripción (National Human Genome Research Institute, 2025d).

Psicrófilo:

Microorganismos que tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes fríos resultado de la evolución y adaptación (Belmar & Alfonso, 2018).

Capítulo 1

Introducción

Durante las últimas décadas, el avance de las técnicas de biotecnología e ingeniería genética han permitido un aprovechamiento más eficiente de microorganismos con potencial industrial, dentro de los cuales se encuentra *Xanthophyllomyces dendrorhous*, una levadura basidiomiceta de pigmentación naranja/roja, resultado de la acumulación del carotenoide astaxantina. Debido a esta capacidad, y a su potencial para producir compuestos de valor agregado, esta levadura se considera una plataforma prometedora para la obtención de carotenoides, ácidos grasos y otros derivados de acetil-CoA, con aplicaciones en las industrias alimentaria, cosmética, farmacéutica y acuícola.

La producción biotecnológica de astaxantina, cantaxantina, fitoeno, licopeno y otros carotenoides representa una alternativa sustentable y segura frente a su síntesis química, la cual implica procesos costosos y poco amigables con el medio ambiente. Sin embargo, uno de los principales retos con *X. dendrorhous* es la optimización de su rendimiento metabólico, sobre todo en la regulación de los genes involucrados en la biosíntesis de astaxantina.

La identificación y caracterización de promotores inducibles constituye una estrategia clave para mejorar la expresión de genes de interés bajo condiciones específicas de cultivo. Estos promotores permiten un control temporal y cuantitativo más preciso sobre la expresión génica, lo cual es fundamental en procesos de fermentación industrial, ya que la sobreproducción constitutiva de metabolitos puede comprometer el crecimiento celular y la viabilidad del cultivo.

El conocimiento sobre promotores inducibles por estímulos externos en *X. dendrorhous* aún es limitado, lo que restringe las posibilidades de manipulación genética eficiente en esta levadura. Por ello, el presente trabajo se enfoca en la identificación de promotores inducibles que permitan incrementar la producción de astaxantina de forma controlada.

Se exploran regiones promotoras asociadas a genes cuya expresión está regulada por condiciones ambientales o nutricionales específicas. A través del análisis bioinformático y la validación experimental mediante técnicas moleculares -como la construcción de vectores reporteros y la transformación genética de cepas de *X. dendrorhous*-, se busca establecer secuencias promotoras funcionales.

La importancia de este trabajo radica en la generación de conocimiento fundamental sobre los mecanismos de regulación génica en una levadura no convencional, lo cual tiene implicaciones directas en el diseño de estrategias de bioprocесamiento más eficientes y sostenibles. Además, el desarrollo de sistemas de expresión inducibles robustos contribuye significativamente al avance de la biotecnología microbiana y a su integración en procesos industriales de tercera y cuarta generación.

En conjunto, este trabajo busca sentar las bases para el uso de promotores inducibles en *X. dendrorhous*, con el fin de consolidar plataformas biotecnológicas más productivas y adaptadas a las demandas actuales del mercado y del entorno regulatorio.

Capítulo 2

Marco Teórico

Xanthophyllomyces dendrorhous

Regulación de la expresión génica

Promotores

2.1 *Xanthophyllomyces dendrorhous*

X. dendrorhous, anteriormente conocido como *Phaffia rhodozyma* en su forma anamorfa, recibió este nombre en honor a Herman Jan Phaff quien la aisló por primera vez en la década de 1970. Inicialmente, se aislaron diez cepas de esta levadura: nueve de ellas en Japón provenientes de árboles de hoja caduca que crecían sobre especies de los géneros *Alnus*, *Betula*, *Cornus*, *Fagus* y *Ulmus*, y una cepa aislada posteriormente en Alaska, también de un árbol del género *Betula* (Gimeno, 2019).

Esta levadura es capaz de fermentar una amplia variedad de azúcares, como maltosa, glucosa, rafinosa y sacarosa. Pertenece al grupo de los basidiomicetos y es la única levadura que produce de manera nativa astaxantina, también conocida como 3,3'-dihidroxi- β , β -caroteno-4,4 diona. Posteriormente, también fue clasificada como una levadura anamórfica (García, 2012).

2.1.1 Características generales

X. dendrorhous se caracteriza por ser levemente psicrófila, con una temperatura óptima de crecimiento que oscila entre los 20°C hasta los 26°C (Fariás-Álvarez et al., 2018). Su clasificación taxonómica, tomada del portal NCBI (*Taxonomy browser*, s. f.), se presenta en la Figura 1.

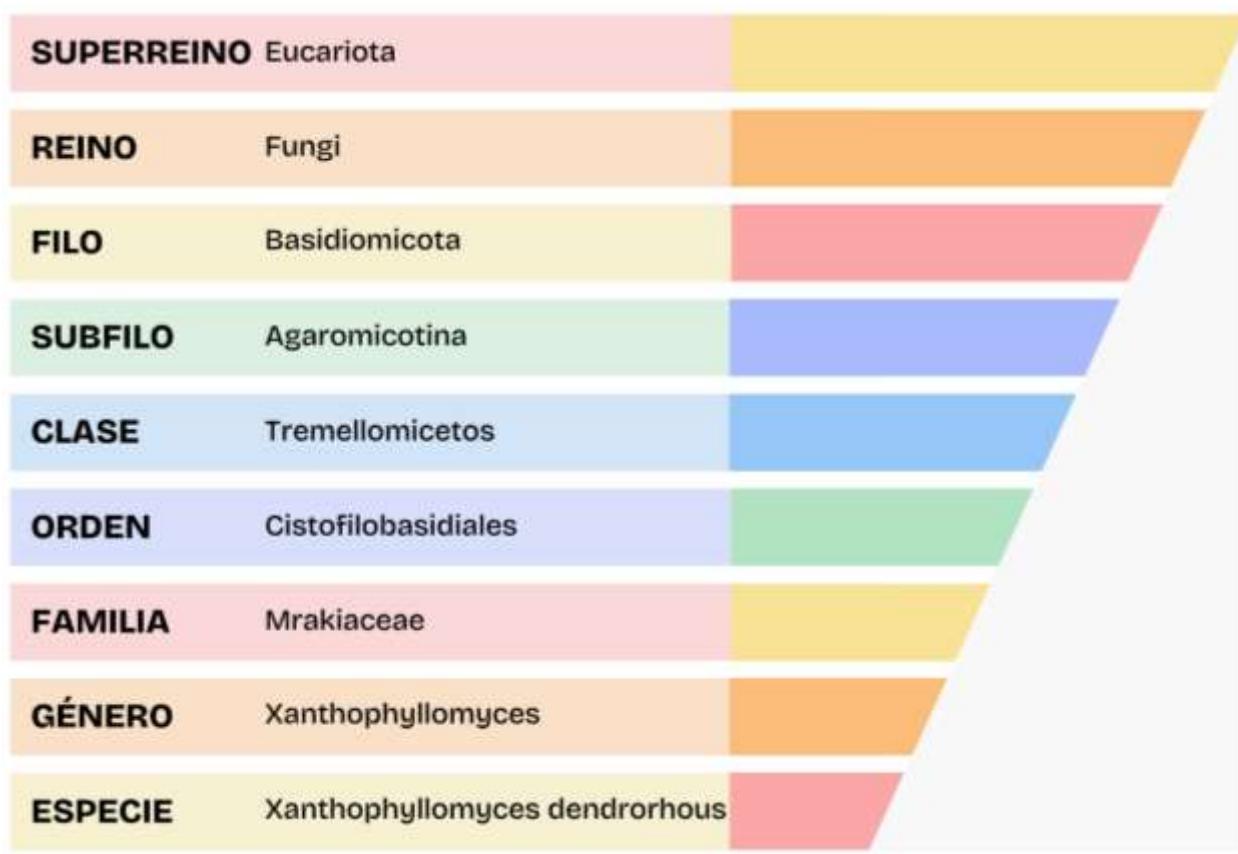


Figura 1. Clasificación taxonómica de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Esta levadura es capaz de sintetizar astaxantina, un carotenoide que corresponde a una forma oxidada de β -caroteno y posee una capacidad antioxidante hasta diez veces superior a la del caroteno y la luteína. Además, su capacidad antioxidante puede alcanzar hasta cien veces más que el α -tocoferol. Las propiedades antioxidantes y de pigmentación en la astaxantina se deben a su estructura química que consta de dos anillos terminales unidos por un sistema conjugado de polieno (Rangel, 2020).

Aunque *X. dendrorhous* tiene la capacidad natural de producir astaxantina, las cepas silvestres presentan rendimientos relativamente bajos, con una producción que varía entre 0.2-0.4mg/g de biomasa seca, lo que representa una eficiencia de conversión del sustrato del 0.2 al 0.3% (Torres-Haro *et al.*, 2021). Debido a esto, se han desarrollado cepas mutantes y procesos de fermentación optimizados que permiten aumentar significativamente la producción de este carotenoide. Por

ejemplo, cepas obtenidas mediante mutagénesis como Y119 han alcanzado niveles de hasta 6.4 mg/g de biomasa seca, mientras que otras cepas mejoradas por evolución adaptativa, como ALE105, han logrado entre 6.5 y 8.36 mg/g (Yang *et al.*, 2023). En un estudio reciente, la cepa DW6, cultivada con melaza de caña y utilizando una estrategia de fermentación a dos fases de pH, logró una producción de 9.0 mg/g de astaxantina, con un rendimiento volumétrico de aproximadamente 374 mg/L (Zhou *et al.*, 2024).

Los enfoques principales para obtener cepas hiperproductoras de astaxantina incluyen estudios genéticos, fisiológicos y de ingeniería metabólica enfocados en optimizar las rutas biosintéticas del carotenoide (Figura 2).

Debido a sus características fisiológicas y metabólicas, *X. dendrorhous* ha sido objeto de diversos estudios orientados a comprender la regulación de la carotenogénesis, incluyendo investigaciones genéticas, transcriptómicas y de ingeniería metabólica (Barredo *et al.*, 2017). Entre estos estudios se encuentran análisis de los genes involucrados en la ruta biosintética de la astaxantina, como *crtYB*, *crtI* y *crtS*, así como experimentos de expresión heteróloga y mutagénesis para aumentar su producción. El genoma completo de esta levadura ya ha sido secuenciado, lo cual ha permitido el desarrollo de estrategias biotecnológicas avanzadas para su manipulación genética.

Además de carotenoides, esta levadura también es capaz de producir diversos sacáridos y polisacáridos extracelulares, como mananos y glucanos, los cuales poseen aplicaciones en biotecnología y en la industria alimentaria. Por otra parte *X. dendrorhous* puede alcanzar altas tasas de crecimiento tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, lo que la convierte en una plataforma microbiana versátil para procesos fermentativos (Barredo *et al.*, 2017).

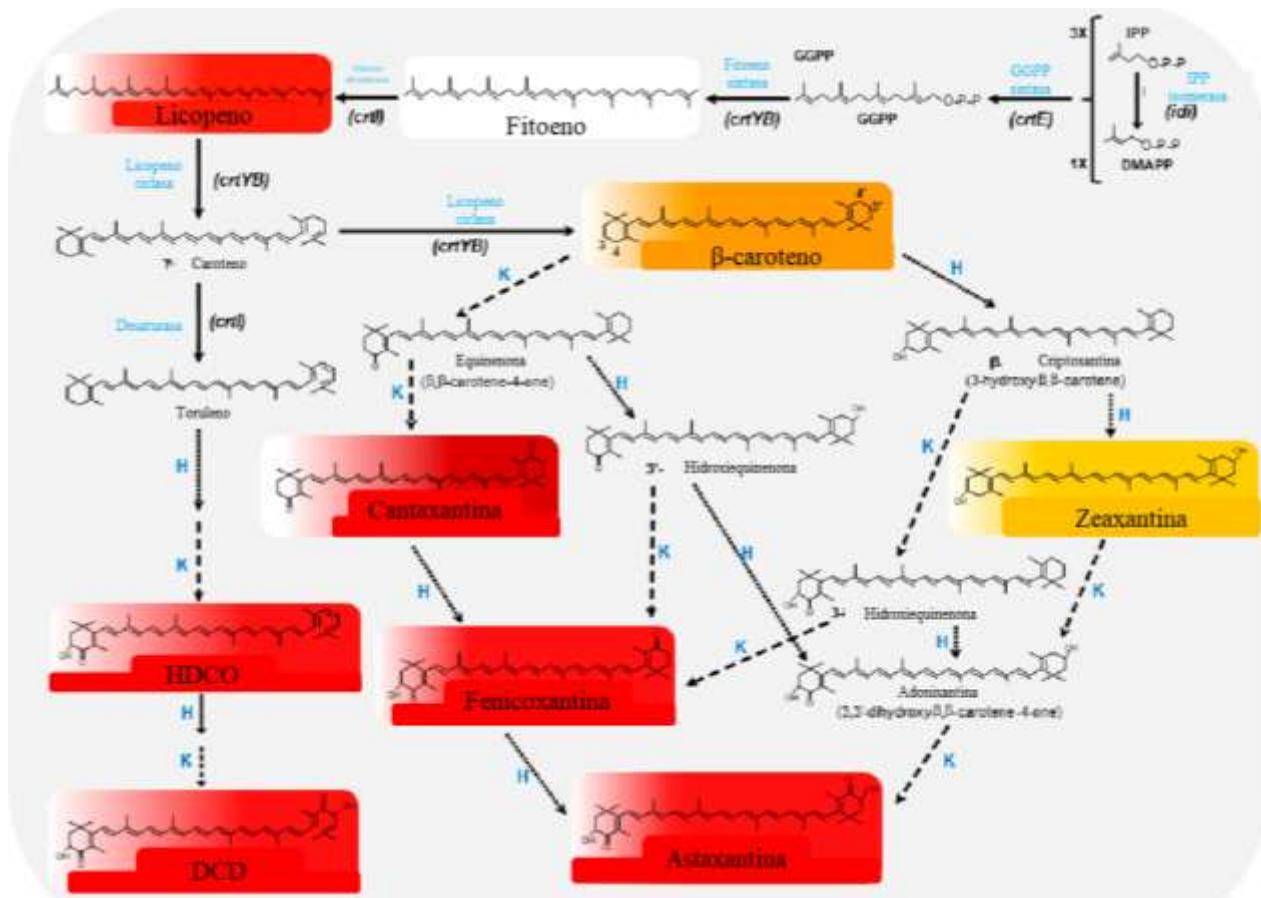


Figura 2. Ruta de la biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* (Barredo *et al.*, 2017).

2.1.2 Efecto de las fuentes de carbono en la producción de astaxantina en *X. dendrorhous*

Además de los mecanismos genéticos, la disponibilidad y el tipo de fuentes de carbono influyen significativamente en la regulación de la carotenogénesis. Según Martínez (2018), *X. dendrorhous* tiene la capacidad de utilizar una amplia variedad de compuestos como fuente de carbono, entre ellos polisacáridos como almidón, monosacáridos como glucosa y fructosa, disacáridos como sacarosa y maltosa, así como alcoholes como etanol y ácidos orgánicos como ácido acético.

Se ha observado que el uso de fuentes de carbono de lenta asimilación, como el etanol o el acetato, puede inducir un aumento en la acumulación intracelular de carotenoides, particularmente astaxantina. No obstante, este efecto puede ir acompañado de una reducción en la tasa de crecimiento celular, debido a la menor eficiencia energética de estas fuentes en comparación con azúcares de rápida metabolización.

También se ha identificado que la represión catabólica es un factor determinante en la regulación de la carotenogénesis. En particular, la presencia de altas concentraciones de glucosa provoca una disminución en la transcripción de genes clave como *crtYB*, *crtI* y *asy*, lo cual coincide con una reducción progresiva en el contenido celular de carotenoides. Este fenómeno respalda la observación de que la carotenogénesis ocurre de manera más eficiente cuando se emplean bajas concentraciones de glucosa o fuentes de carbono no fermentable, como etanol o acetato (Martínez, 2018).

2.2 Regulación de la expresión génica

La expresión génica es el proceso mediante el cual la información contenida en el ADN se utiliza para sintetizar ARN y proteínas. Este proceso se inicia con la transcripción, que consiste en la síntesis de una molécula de ARN a partir de una secuencia específica de ADN.

Una parte crítica de la regulación génica se da a nivel transcripcional, en donde la ARN polimerasa tiene un papel central al unirse en regiones promotoras del DNA para iniciar la transcripción. Los organismos eucarióticos cuentan con tres tipos de RNA polimerasa (I, II y III), que producen una amplia variedad de RNAs, la pol I transcriben genes que codifican para RNA ribosómico; la pol II para genes codificantes de proteínas y algunos RNA pequeños nucleares; mientras que la pol III transcribe genes que codifican para RNA de transferencia, ribosómicos y pequeños (Rienzo, 2015).

El RNA pol I es responsable de la transcripción de los genes que codifican para los RNAr (18S, 5.8S y 28S), los cuales son componentes esenciales en la formación de ribosomas. Esta polimerasa reconoce regiones promotoras específicas ubicadas en los organizadores nucleares, donde inicia la síntesis de RNA esenciales para la biogénesis ribosomal y el crecimiento celular (Engel et al., 2013).

La RNA polimerasa II es la responsable de transcribir los genes que codifican para RNAm (ácido ribonucleico mensajero) dentro de la célula, así como algunos ARN pequeños nucleares (RNAsn). Esta enzima reconoce promotores comúnmente contienen elementos como la caja TATA y su actividad se regula por factores diversos de transcripción específicos. La función es clave en la expresión génica, ya que produce los RNA que serán traducidos en proteínas (Engel et al., 2013).

La polimerasa III transcribe principalmente RNAt (RNA de transferencia), los RNA celulares de forma abundante y algunos RNA no codificantes y pequeños, como el RNA nuclear pequeño de empalme U6 (snRNA) y el RNA5S (RNA ribosomal 5S). Una gran cantidad de los antes mencionados se relacionan con la biogénesis de los ribosomas y síntesis de proteínas, por lo tanto, la transcripción mediada por Pol III se caracteriza por una transición eficiente (Li et al., 2021).

En resumen, la expresión génica implica la conversión de información genética en ARN codificantes (que serán traducidos a proteínas) o ARN no codificantes con funciones regulatorias o estructurales. La regulación de este proceso es altamente específica y depende de múltiples factores, entre los que los promotores desempeñan un papel esencial al dirigir la maquinaria transcripcional hacia los genes apropiados en respuesta a señales internas y externas.

2.3 Promotores

La transcripción se considera como el primer paso dentro de la expresión génica, durante este proceso se sintetiza una molécula de ARN complementaria a una de las cadenas de ADN (Sánchez, 2007).

Este proceso está altamente regulado por secuencias promotoras, las cuales son regiones del ADN localizadas en la misma hebra que el gen, normalmente “río arriba” (en dirección 5') del sitio de inicio de la transcripción. Los promotores controlan la expresión génica al dirigir la ARN polimerasa hacia las regiones adyacentes que deben ser transcritas. Estas secuencias contienen sitios específicos de unión para factores de transcripción, que pueden activar o reprimir la transcripción según las condiciones medio ambientales y fisiológicas de las células (Potenza *et al.*, 2004). En la figura 3 se muestra un esquema representativo de un promotor típico.

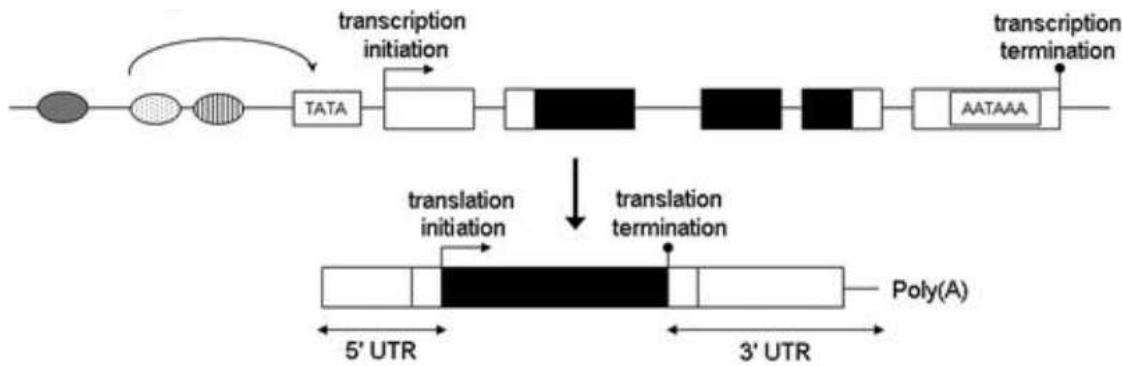


Figura 3. Estructura eucariótica del gen y unidades de transcripción. La caja TATA representa un elemento promotor, al cual los factores transmiten información. El inicio de la transcripción ocurre por el reconocimiento de la secuencia promotora que codifica al gen (Lynch, 2005).

Podemos encontrar dos regiones dentro de un promotor eucariótico, primero la zona que se localiza 35 nucleótidos antes del inicio de la transcripción (-35) en donde ocurre la unión del ARN polimerasa. Y otra ubicada alrededor de los 10 nucleótidos antes (-10), rica en adeninas y timinas, que facilita la apertura de la doble hélice de ADN, marcando el inicio de la región que será transcrita (Torres, 2013).

Características de los promotores eucarióticos

- Caja TATA

En 1978 Michael Goldberg, David Hogness y colaboradores descubrieron una caja inmutable rica en adeninas y timinas, se le denominó ATA o caja TATA, dicha caja es un sitio de unión para una proteína TBP. La localización de la caja es “río arriba” del inicio de la transcripción y se ubica en la región promotora de los genes, lugar donde se une con algunos factores de transcripción (Ponomarenko *et al.*, 2013).

- Caja CAAT

Esta caja es una región de nucleótidos con la secuencia consenso de CAAT, esta se encuentra en la región del promotor de los genes con un aproximado de 75 y 80 pb “río arriba” del sitio de transcripción. La unión de la caja y los factores de transcripción aportan estabilidad a la iniciación que a su vez facilitará la unión de la enzima ARN polimerasa (González, 2010).

- Secuencias reguladoras distales

Secuencias potenciadoras (enhancer) son claves en la regulación de expresión de genes espacio-temporales específicos de genes afines, por lo cual potencian la tasa de transcripción de otros promotores con activadores por interacciones cromosómicas de largo alcance (Schoenfelder & Fraser, 2019).

2.3.1 Tipos de promotores

Los promotores pueden clasificarse no solo según el tipo de ARN polimerasa que los reconoce, sino también en función de su actividad reguladora. De acuerdo con este criterio, se distinguen dos tipos principales: constitutivos e inducibles, que se basa en si está siempre activo o si requiere de un estímulo específico para activarse.

2.3.1.1 Constitutivos

Un promotor se puede considerar constitutivo, si este mantiene una actividad constante, independientemente de las condiciones del medio de cultivo o de señales reguladoras específicas. En estos promotores no existe una regulación por activadores o represores específicos, lo que permite una expresión génica continua.

Una de las principales ventajas es que los promotores constitutivos inducen altos niveles de expresión transgénica sin importar el estadio (Park *et al.*, 2010). Por esta razón, se emplean para inducir la expresión de genes ectópicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Qin *et al.*, 2010).

2.3.1.2 Inducibles

Un promotor se puede considerar inducible si activa o reprime la transcripción génica en respuesta a estímulos específicos, como señales endógenas, factores ambientales (estrés abiótico y biótico) o por estímulos químicos externos (Cortes, 2012). Otra forma de controlarlos es mediante el uso de sustratos específicos o cambios de temperatura (Liu *et al.*, 2004).

A diferencia de los promotores constitutivos, los inducibles permiten regular temporalmente la expresión de genes, lo que resulta útil para estudiar funciones génicas específicas o para minimizar efectos tóxicos asociados a la expresión continua de ciertas proteínas. Además, facilita la modulación localizada de la expresión génica sin generar alteraciones importantes (Borghi, 2010).

En *X. dendrorhous*, hasta el momento solo se han caracterizado promotores inducibles por luz UV, y no se han identificado promotores inducibles por fuentes de carbono. Se sabe que muchos promotores inducibles por una fuente de carbono se regulan por el represor Mig1, el cual inhibe la transcripción de genes implicados en la utilización de fuentes de carbono alternativas cuando hay abundancia de glucosa. Este mecanismo se conoce como represión catabólica y representa una vía de control eficiente para adaptar el metabolismo a las condiciones del entorno.

Una de las principales ventajas de los promotores inducibles es que permite un control preciso y temporal sobre la expresión génica, que resulta útil en estudios funcionales, ya que permite evaluar el efecto de un gen sin interferencias por expresión continua. Además, su uso reduce el riesgo de efectos tóxicos derivados de la sobreexpresión de ciertos productos génicos, clave en procesos biotecnológicos. La posibilidad de modular la expresión en función a variables externas, como

temperatura, luz o disponibilidad de nutrientes, los convierte en herramientas versátiles para el diseño de sistemas regulables en investigación y producción industrial.

2.3.2 Promotores inducibles por carbohidratos

2.3.2.1 Galactosa

Los genes *GAL1*, *GAL7* y *GAL10* son ejemplos de promotores inducibles por galactosa en *Saccharomyces cerevisiae*, estos promotores se activan particularmente cuando la galactosa está presente como fuente de carbono y se reprime en presencia de glucosa. Dicho sistema esta mediado por el factor de transcripción Gal4p, esta actividad se libera tras la interacción de la galactosa con Gal3p, que inhibe al represor Gal80p. Estos promotores se utilizan para que al adicionar la galactosa en un momento específico se inicie la expresión de proteínas o enzimas de forma específica y controlada (Yocum *et al.*, 1984).

2.3.2.2 Lactosa

Un promotor inducible por lactosa es el de *LAC4* en *Kluyveromyces lactis*, este promotor controla la expresión del gen que codifica para la β-galactosidasa, enzima responsable de la hidrólisis de la lactosa en galactosa y glucosa. Con este sistema se han desarrollado estrategias de selección basadas en lactasa para mejorar la expresión de proteínas recombinantes y facilitar la selección de cepas con alta capacidad de expresión (Krijger *et al.*, 2012).

2.3.2.3 Maltosa

Cheng & Miles (1991) identificaron y caracterizaron los genes *MAL11* y *MAL61* que son inducibles por maltosa en *S. cerevisiae*, este promotor se reprime por glucosa. El promotor *MAL61* en *S.*

cerevisiae se ha utilizado para controlar la expresión de genes heterólogos en sistemas de producción de proteínas recombinantes, un ejemplo es expresar enzimas como lipasas en medios de maltosa, lo que permite una inducción controlada y evita la expresión basal en ausencia de sustrato.

2.3.3 Promotores inducibles por fuentes de carbono no fermentables

2.3.3.1 Etanol

En esta categoría se encuentra el promotor del gen *ICL1*, el cual es uno de los promotores más importantes que codifica para isocitrato liasa 1, involucrada en el ciclo del glicoxilato, una ruta metabólica que permite a la célula crecer utilizando compuestos como el etanol o el acetato como única fuente de carbono (Santos, 2008).

Marín (2019) utilizó el promotor *ICL1* en *P. pastoris* para inducir la expresión de dextranasa recombinante bajo condiciones específicas de cultivo. En este estudio, se empleó un sistema en lote alimentado, donde durante la fase de crecimiento exponencial se suministró glucosa como fuente de carbono, lo cual reprimió la actividad del promotor. Posteriormente, al agotarse la glucosa y pasar a la fase estacionaria, se adicionó etanol, lo que activó la expresión del gen recombinante. Este cambio promovió una mayor expresión proteica.

2.3.3.2 Glicerol

En *S. cerevisiae* se conoce un promotor útil en sistemas en los que se busca evitar la expresión basal y activarla solo bajo condiciones específicas, el glicerol puede inducir la expresión de algunos genes involucrados en su metabolismo como fuente de carbono no fermentable. Este promotor es el del gen *GUT1*, que codifica la glicerol quinasa y se ha utilizado para la producción de enzimas industriales o proteínas terapéuticas, debido al aprovechamiento de su activación en condiciones respiratorias (Grauslund & Ronnow, 2000).

2.3.3.3 Acetato

En *S. cerevisiae*, el acetato puede actuar como fuente de carbono no fermentable, y en la presencia de este se induce la expresión de genes involucrados en rutas respiratorias y gluconeogénicas. El promotor principalmente caracterizado bajo las condiciones antes mencionadas es del gen *ACSI*, que codifica una isoforma de acetil-CoA sintetasa. El promotor del gen *ACSI* se activa cuando el acetato está presente como fuente de carbono, y su acción se reprime en condiciones de glucosa. El promotor *PACSI* (*ACSI*) se ha empleado para expresar genes de interés en *S. cerevisiae* en condiciones de crecimiento de acetato, importante en estudios o ingeniería metabólica para la producción de metabolitos como lípidos o compuestos aromáticos (Lee *et al.*, 1990).

2.3.3.4 Metanol

En *Pichia pastoris* el metanol es utilizado como única fuente de carbono y actúa como un potente inductor de la expresión génica. El promotor *AOX1* (alcohol oxidasa 1), regula el gen que codifica alcohol oxidasa, la enzima que cataliza la oxidación del metanol a formaldehído. Este promotor es fundamental en varios sistemas de expresión industrial, donde se inserta el gen de interés bajo este promotor para lograr una producción muy alta de proteínas recombinantes, anticuerpos o proteínas, solo añadiendo en el cultivo metanol (Cregg *et al.*, 1985).

2.3.3.5 Oleato

El oleato es un ácido graso insaturado que actúa en *Yarrowia lipolytica* como un potente inductor para la expresión de genes involucrados en la β-oxidación y el metabolismo de lípidos, en esta levadura se ha caracterizado el promotor *POX2*, que controla la expresión del gen que codifica una acel-CoA oxidasa, enzima básica en la degradación de ácidos grasos.

El promotor *POX2* se ha utilizado en la expresión controlada de proteínas heterólogas en medios de cultivo con oleato, que permite la producción dirigida de enzimas lipolíticas o proteínas involucradas con el metabolismo lipídico (Smith *et al.*, 2000).

2.3.4 Promotores que se inducen con otros estímulos

Además de fuentes de carbono, existen promotores que responden a otros tipos de estímulos, como la temperatura, disponibilidad de metales o condiciones de estrés ambiental. Estos promotores son especialmente útiles en sistemas de expresión regulables, ya que permiten inducir la transcripción génica sin necesidad de modificar el medio nutricional. A continuación, se describen algunos ejemplos relevantes.

Uno de ellos es el promotor *Pectα*, sensible a bajas temperaturas utilizado por Bartolo (2017) en *P. pastoris* para promover la expresión del gen *eng* involucrado en la degradación de la pared celular. Al activarse en condiciones de frío, este promotor permitió generar esferoplastos por el debilitamiento de la pared celular, lo que facilitó la lisis celular controlada, para la liberación de proteínas recombinantes.

Otro ejemplo bien caracterizado es el promotor CUP1 en *S. cerevisiae*, que se activa en presencia de iones de cobre. Este promotor regula la expresión de metalotioneínas que protegen a la célula contra la toxicidad por metales pesados. Su activación dependiente del ion metálico se ha utilizado como un sistema regulable para controlar la expresión de genes sin alterar la fuente de carbono que compone el cultivo (Butt *et al.*, 1984).

También se ha descrito la activación del gen *OLE1* en *S. cerevisiae*, el cual codifica para una desaturasa de ácidos grasos, en respuesta a temperaturas bajas. Estudios como el de Nakagawa y otros (2002) sugiere que su regulación está conectada con rutas de respuesta hipódica y térmica, lo que lo convierte en una opción interesante para estrategias de ingeniería genética.

Capítulo 3

Justificación

Hipótesis

Objetivo General

Objetivos Particulares

Metodología

3.1 Justificación

X. dendrorhous es una levadura basidiomiceta de interés industrial debido a su capacidad para sintetizar carotenoides y fermentar una variedad de sustratos. Aunque ya se han caracterizado promotores fuertes constitutivos, aún no se cuenta con información detallada sobre promotores inducibles dependientes de fuentes de carbono.

Además, es importante destacar que el uso de promotores inducibles permitiría que la levadura alcance un mayor crecimiento y densidad celular utilizando fuentes de carbono no inductoras, antes de activar la sobreexpresión de genes relacionados con la síntesis de carotenoides. Esto se traduciría en una reducción de los costos del proceso de fermentación y, al mismo tiempo, en un aumento en la producción de carotenoides de interés, como la astaxantina.

3.2 Hipótesis

Si *X. dendrorhous* posee promotores sensibles a sustratos específicos o al estrés térmico, entonces la construcción de un plásmido con el gen reportero permitirá su identificación, contribuyendo al desarrollo de sistemas de expresión génica regulables para optimizar la producción de compuestos de interés biotecnológico.

3.3 Objetivo General

Identificar promotores inducibles en *X. dendrorhous* que respondan a estímulos como sustratos específicos o condiciones de estrés térmico.

3.4 Objetivos Particulares

- I. Analizar genes cuya expresión sea inducida por diversos sustratos y/o por estrés térmico en *X. dendrorhous*.

- II. Determinar las regiones promotoras asociadas a los genes seleccionados.
- III. Diseñar un sistema de expresión que permita evaluar la actividad de diferentes promotores inducibles.
- IV. Insertar las secuencias promotoras seleccionadas en un sistema de expresión génica.
- V. Establecer cepas de *X. dendrorhous* modificadas genéticamente para portar los promotores seleccionados.
- VI. Evaluar la actividad de los promotores inducibles mediante el análisis de la expresión del gen reportero.

3.5 Metodología

La metodología (Figura 5) consistió en la selección de genes potencialmente inducibles en *X. dendrorhous* que respondieran a diferentes sustratos (fermentables y no fermentables) y al estrés térmico, a partir de una revisión bibliográfica y un diseño experimental preliminar. Se identificaron las secuencias promotoras putativas de estos genes utilizando herramientas bioinformáticas, y se diseñaron iniciadores específicos para su amplificación por PCR.

Posteriormente, empleando técnicas de clonación molecular se construyó un plásmido modular que contenía el gen de la YEFP y un sitio de clonación múltiple con el sitio BsaI. Las secuencias promotoras seleccionadas fueron clonadas en el plásmido, y posteriormente las células competentes de *X. dendrorhous* fueron transformadas con las construcciones recombinantes.

La evaluación de la expresión del gen reportero *YEFP*, como indicador de la actividad promotora en respuesta a los estímulos experimentales, fue una etapa considerada dentro del diseño experimental. Esta fase contemplaba la medición de fluorescencia como herramienta para identificar

promotores inducibles. Sin embargo, dicha evaluación no se realizó dentro del periodo experimental de este trabajo y se propone como trabajo futuro.

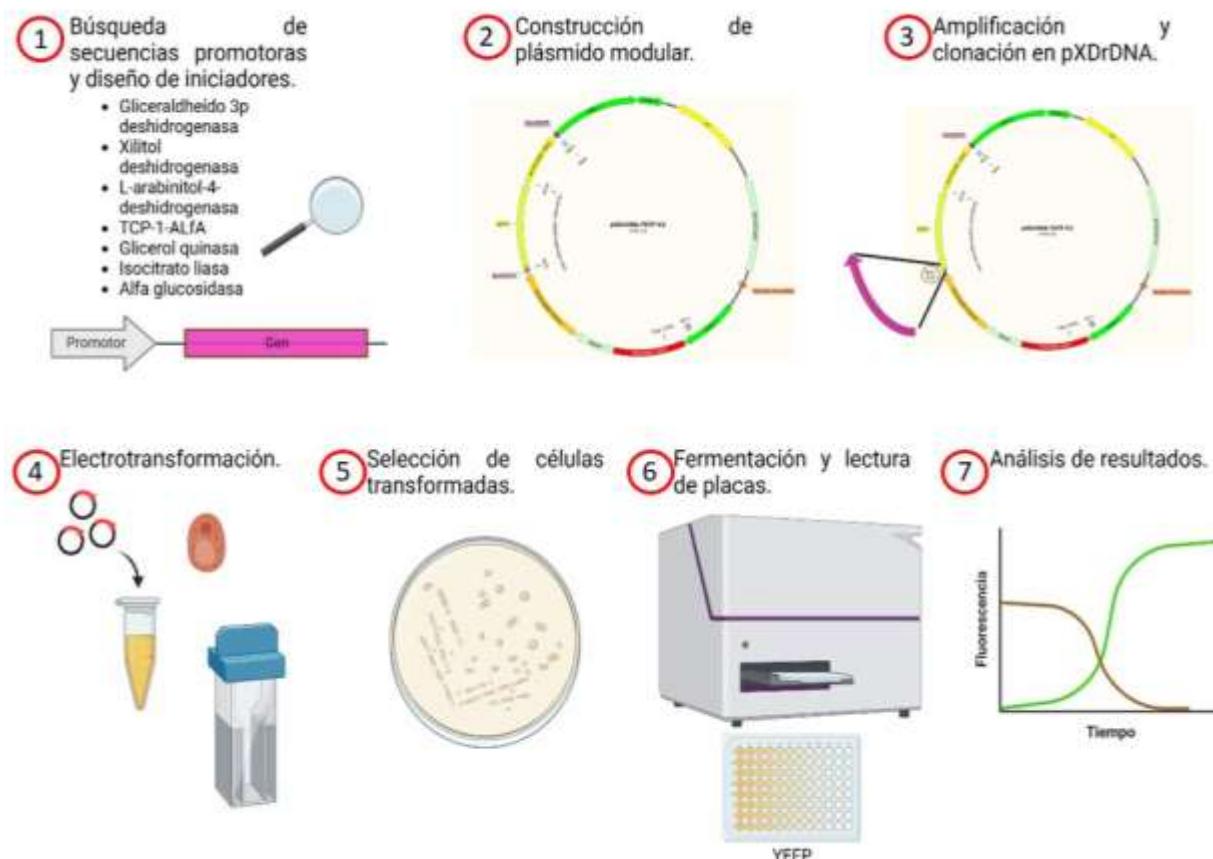


Figura 4. Estrategia experimental.

Capítulo 4

Materiales y

Métodos

Material biológico

Plásmidos

Extracción y análisis de ácidos nucleicos

Reacción en cadena de la polimerasa

Clonación y subclonación de módulos

Transformación

Cracking

Digestión enzimática

Diálisis

Precipitación por etanol

4.1 Material biológico

4.1.1 Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas de *X. dendrorhous* y *E. coli* utilizadas se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas utilizadas

Cepa	Característica	Procedencia
DH5 α	Cepa de <i>E. coli</i> para conservar y propagar plásmidos.	Colección del laboratorio 48 de metabolismo secundario de microorganismos CINVESTAV
ATCC 96594	Cepa de <i>X. dendrorhous</i> haploide	Colección del laboratorio 48 de metabolismo secundario de microorganismos CINVESTAV

La cepa de *X. dendrorhous* (ATCC 96594) se cultivó a 21°C y 120rpm en medio YM (Extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%, bactopeptona 0.5% y glucosa 1%). Las colonias transformadas se cultivaron en placas de YM con agar al 2% y se suplementaron con Zeocina (150 μ g/mL). *E. coli* DH5 α se cultivó en medio LB a 37°C y 150rpm, suplementado con el antibiótico adecuado (ampicilina o kanamicina 100 μ g/mL).

4.2 Plásmidos

Tabla 2. Plásmidos empleados

Plásmido	Resistencia	Descripción
pJET 1.2 blunt	Ampicilina	Vector de clonación en <i>E. coli</i> .
pXDrDNA	Kanamicina	Colección laboratorio 48
pAG413GPD-ccdB-EYFP	Cloranfenicol	Colección laboratorio 50

4.3 Extracción y análisis de ácidos nucleicos

4.3.1 Extracción de DNA genómico de levadura

El DNA genómico de levadura se extrajo siguiendo el protocolo de Peter Espenshade Rapid Isolation of Yeast DNA (Sambrook, 2001).

4.3.2 Extracción de DNA plasmídico

El DNA plasmídico se extrajo usando dos metodologías: La técnica de Birnboim y Doly (Birnboim & Doly, 1979) para análisis posterior a clonaciones, subclonaciones o transformaciones con el kit Plasmid Purification (QIAGEN) para ADN destinado a transformación en *X. dendrorhous*.

4.3.3 Purificación de fragmentos de gel de agarosa

Para purificar los fragmentos de DNA de gel de agarosa se utilizó el kit Gel Extraction de QIAGEN y se siguieron las recomendaciones dadas por el fabricante.

4.4 Reacción en cadena de la polimerasa

Se utilizaron 2 tipos de PCR y 1 ADN polimerasa distintas de acuerdo con el objetivo de cada experimento.

PCR de punto final: Para amplificar fragmentos necesarios en la construcción de plásmidos (Enzima: Phusion High Fidelity de thermo scientific).

PCR recombinante: Para unir módulos que conforman cada uno de los plásmidos (Enzima: Phusion High Fidelity de thermo scientific).

4.4.1 Purificación de productos de PCR

Productos sin inespecificidades: purificados con el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research).

Productos con inespecificidades o de PCR recombinante: purificados con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN).

4.4.2 Análisis de ácidos nucleicos

Los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, la concentración fue entre 1 y 3% según el tamaño del fragmento. Se utilizó bromuro de etidio ($0.5\mu\text{g/mL}$) para tinción y el marcador 1 kb plus DNA Ladder para estimar el tamaño de los fragmentos de DNA (Thermo Scientific).

4.5 Clonación y subclonación de módulos

La clonación de YEFP y el terminador GDH se realizó en el plásmido de pJET 1.2 blunt siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las subclonación del fragmento YEFP y el terminador GDH al plásmido pXDrDNA V2 se realizó por la técnica de polimerización azarosa de fragmentos (PAF), basada en las siguientes condiciones:

- Cuando se tiene una concentración de extremos de DNA muy alta durante la ligación, de tal manera que resulte más probable que un extremo de cada fragmento encuentre y se ligue con el extremo de otro fragmento, se formará un polímero al azar de fragmentos; y
- Cuando se tiene una concentración baja de extremos de DNA durante la ligación, de tal manera que resulte más probable el que un extremo de cada fragmento encuentre y se ligue con el otro extremo del mismo fragmento, se cerrará el DNA (se "recirculizará").

Descripción de la técnica.

1.- **Formación del PAF:** Se cortaron los plásmidos con las enzimas correspondientes, se inactivaron las enzimas y los DNAs se ligan entre sí en condiciones de alta concentración de DNA (1 a $4\mu\text{g}$ de DNA en $5\mu\text{L}$) y el tiempo suficiente para que se forme un PAF.

2.- Resolución y recircularización: Se cortó el polímero con la enzima que separa en fragmentos de DNA formados por pares de fragmentos ligados y se ligaron nuevamente, ahora en condiciones de baja concentración de DNA (1 μ g en 250 μ L).

3.- Eliminación de construcciones no deseadas: Se cortaron los DNA recircularizados con una última enzima de restricción que no corte la construcción deseada, pero sí los fragmentos y replicón no deseados y se transforma la cepa de *E. coli* apropiada.

La clonación los promotores en el plásmido pXDrDNA YEFP V2 se realizó mediante reacción tipo Golden Gate.

4.6 Transformación

4.6.1 Transformación de *E. coli*

Se prepararon células competentes según el protocolo de Sambrook y colaboradores (2001). Las alícuotas (50 μ L) se almacenaron a -80°C. La transformación para la propagación y conservación de vectores también se realizó utilizando la técnica de transformación química por choque térmico descrita por Sambrook y las colonias transformadas se seleccionaron en placas de LB con antibiótico.

4.6.2 Transformación de *X. dendrorhous*

Las células electrocompetentes de *X. dendrorhous* se prepararon siguiendo el protocolo de Adrio y Veiga (1995). Se inoculó un matraz con una colonia de *X. dendrorhous* hasta alcanzar una *D.O.*₆₀₀ de 4-5. Las células se centrifugaron y resuspendieron en 25 ml de solución BD (50mM K_2HPO_4 pH 7.0, 25mM DTT), incubando 15 minutos a 22°C.

Posteriormente, se realizaron dos lavados con solución STM fría (270mM sacarosa, 10mM Tris-HCl pH7.5 y 1mM $MgCl_2$). El paquete celular se resuspendió en 300 μ L de STM, y se prepararon alícuotas de 50 μ L que se utilizarán inmediatamente.

Para la transformación, se mezclaron entre 5 y 10 μ g de ADN plasmídico con 50 μ L de células electrocompetentes en una celda de electroporación de 2mm de amplitud. Tras 5 minutos en hielo, se aplicó un pulso eléctrico usando el Bio-Rad Micropulser (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) con el protocolo Sac 2. Las células, se recuperaron en 1 mL de medio YM reposando por al menos 3 horas y se sembraron en placas de YM con zeocina.

4.7 Colony Cracking

Esta técnica se utilizó para la evaluación rápida de plásmidos con o sin inserto. Se utilizaron 30 μ L de cultivo, que se centrifugaron en tubos para PCR. Se descartó el sobrenadante y se mantuvo la pastilla celular.

Se añadieron 20 μ L de buffer de lisis y 20 μ L de agua PiSA, se mezcló en vortex y se analizó en gel de agarosa (McCoy, 1999).

- Solución de lisis: EDTA 10 mM; Tris-HCl 10 mM; NaOH 0,1 N; SDS 1% (v/v).

4.8 Digestión enzimática

Las enzimas de restricción utilizadas se adquirieron de New England Biolabs, Inc. (NEB, Beverly, Mass.) e Invitrogen, Inc., (Carlsbad, CA, USA). Se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.9 Purificación de DNA mediante diálisis

Se utilizaron filtros Millipore de 0.025 μ m, cortados en cuatro partes y esterilizados. Se colocó un cuarto de membrana en agua desionizada dentro de una caja Petri estéril, con el lado brilloso hacia

arriba. Se aplicaron 20 μ L de muestra sobre la membrana y, después de 20-30 minutos, se recuperó el volumen. La muestra se cargó en gel para evaluar concentración y pureza (Silhavy *et al.*, 1984).

4.10 Purificación de DNA por precipitación con etanol

Se mezclaron 10 μ L de ADN con 1 μ L de acetato de sodio (3M, pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol (Sambrook *et al.*, 1989). La mezcla se incubó a -80°C durante una hora, se centrifugó por 30 minutos en frío y se continuó con los pasos siguientes (Figura 5).

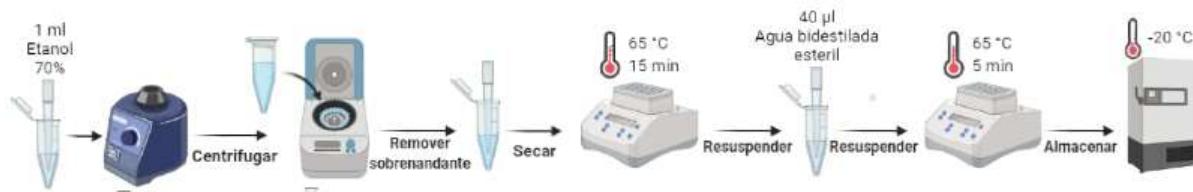


Figura 5. Final de precipitación.

Capítulo 5

Resultados y

Discusiones

Identificación de secuencias promotoras

Diseño del plásmido modular

Diseño de oligos

Construcción del plásmido modular

Amplificación de secuencias promotoras

Clonación de secuencias promotoras al plásmido modular

Transformación de *X. dendrorhous*

5.1 Identificación de secuencias promotoras

Se realizó una recopilación de información documental de algunos genes inducibles ya caracterizados en otras levaduras. Utilizando la herramienta BLAST de NCBI, se buscaron secuencias similares en el genoma de *X. dendrorhous*, lo que dio paso al reconocimiento de posibles secuencias promotoras.

Para delimitar dichas secuencias, fue necesaria la identificación del gen de interés y un gen anterior, por lo cual el promotor putativo se localizó entre ambos genes. Las secuencias mencionadas (gen-terminador-promotor-gen) se organizaron en un archivo de SnapGene, que nos permitió identificar los elementos del promotor y demarcar la región que sería evaluada. Dado que, de forma teórica, es imposible determinar con precisión el final del terminador y el inicio del promotor, se definió como secuencia promotora una base después del codón de paro del gen anterior y hasta una región río arriba del codón de inicio (ATG) del gen de interés.

Durante el desarrollo experimental se trabajó con los promotores inducibles de los genes mostrados en la Tabla 3. Además, se utilizó el promotor de la Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa como control positivo, dado que es constitutivo y se encuentra previamente caracterizado. La búsqueda de promotores inducibles fue más amplia, pero algunos se descartaron. Tal es el caso de *GAL1* y *GAL7*, ya que, aunque se localizaron sus genes, *X. dendrorhous* no metaboliza galactosa.

Tabla 3. Genes inducibles seleccionados

Gen	Inducción	Represión	Número de acceso	Fuente
				acceso
6GPD	Gliceraldehído 3 p deshidrogenasa	-	-	AF006483.1 (Liu <i>et al.</i> , 2012)
AG	Alfa glucosidasa	+Maltosa +Almidón	+Glucosa +Xilosa	AOR81603.1 (Alcaíno <i>et al.</i> , 2016)
TCP-1-ALPHA	Subunidad alfa de la proteína del complejo T	-Descenso de temperatura		CDZ97282.1 (Bartolo, 2017)
XDH	Xilitol deshidrogenasa	+Xilosa	+Glucosa +Manosa +2-desoxi-glucose	CED85526.1 (Seiboth <i>et al.</i> , 2003)
LAD	L-arabinitol 4-deshidrogenasa	+Arabinosa	+Glucosa +Glicerol	<u>CED84470.1</u> (Sullivan & Zhao, 2007)
GUT1	Glicerol quinasa	+Glicerol +Acetato +Etanol +Oleato	+Glucosa	KX384889.1 (Xiberras <i>et al.</i> , 2019)
ICL1	Isocitrato liasa	+Acetato -Glucosa	+Glucosa	CED85129.1 (Schöler & Schüller, 1994)

5.2 Diseño del plásmido modular

El vector pXDrDNA YEFP V2 (Figura 6) fue diseñado para facilitar la clonación de las secuencias promotoras y evaluar su nivel de expresión. Para su construcción, se usó como base el plásmido pXDrDNA, que ya contenía los siguientes elementos: origen de replicación para *E. coli*, gen de resistencia a kanamicina, brazos de recombinación homóloga para *X. dendrorhous* y un casete de resistencia a zeocina.

Se requería la inserción de un casete adicional que se formaba por: 1) la región modular que se constituye de dos sitios de corte pegajoso compatible para la inserción de las secuencias promotoras, 2) el gen *YEFP* y 3) el terminador del gen de la glutamato deshidrogenasa.

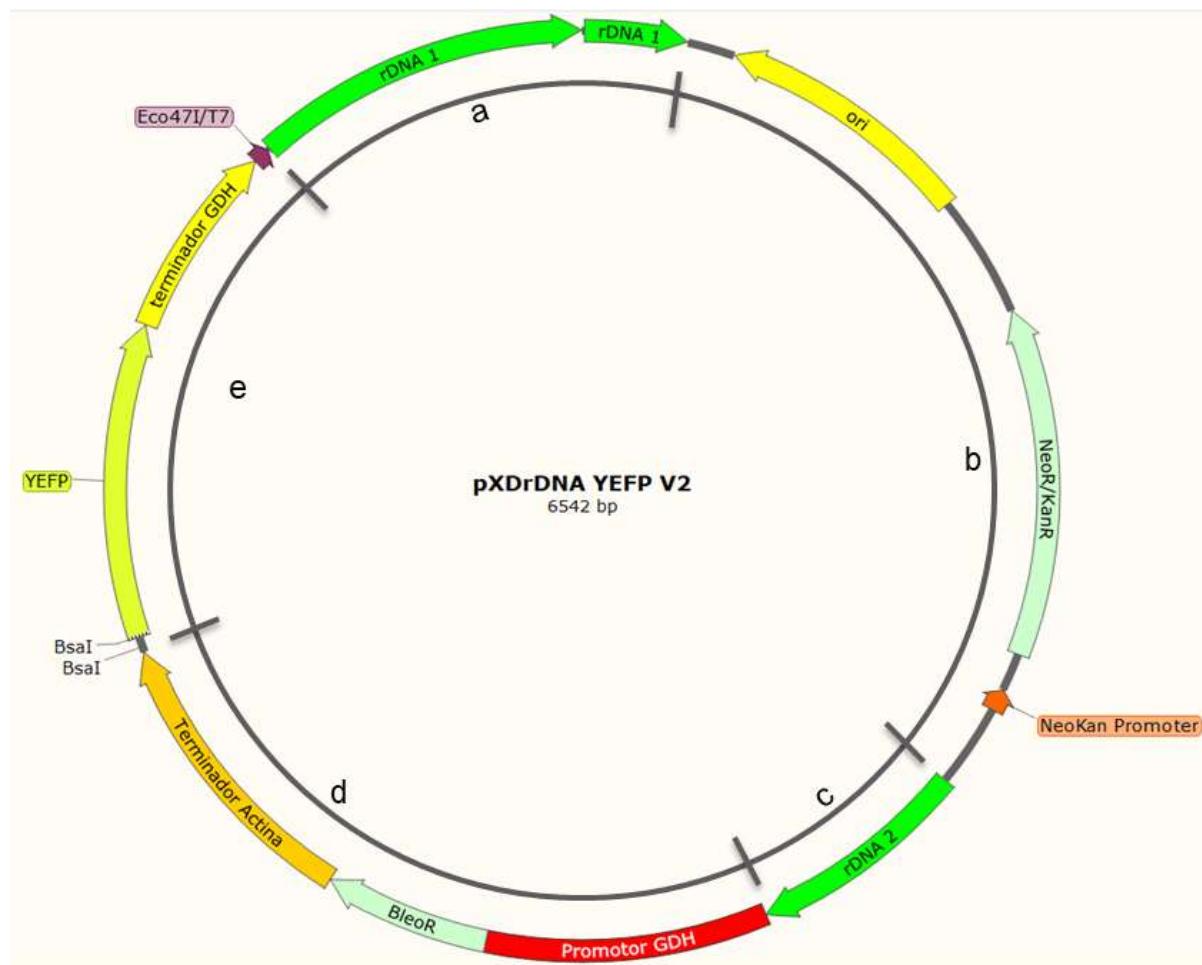


Figura 6. Estructura del vector pXDrDNA YEFP V2. a) y c) corresponden a los brazos de recombinación homóloga para la levadura, b) representa el origen de replicación y el gen de resistencia a kanamicina para *E. coli*, d) casete de resistencia a zeocina en *X. dendrorhous*, y e) casete de expresión que contiene la YEFP.

5.3 Diseño de oligos

Se diseñaron iniciadores (Tabla 4) para amplificar los promotores identificados y posteriormente clonarlos en el plásmido pXDrDNA mediante una reacción de tipo Golden Gate. Para lo cual, se tomaron aproximadamente 20 bases del promotor, procurando que tuvieran una temperatura de alineamiento de $60\pm1^{\circ}\text{C}$. A cada iniciador se le añadieron: seis bases de reconocimiento para la enzima BsaI (GGTCTC) o BsmBI (CGTCTC), cuatro bases que determinarían el sitio de corte para generar extremos cohesivos compatibles, y finalmente, seis bases en el extremo 5' para asegurar una escisión eficiente por parte de la enzima.

Tabla 4. Iniciadores diseñados

NOMBRE	SECUENCIA 5' → 3'	DESCRIPCIÓN
6GPD P F 6GPD P R	<u>GTACATGGTCTCCTAGAACGCAGTGAGTTGCCGTTGG</u> <u>TACATGGTCTCCACCATGATGGAAGAGTAGAGAA-</u> <u>GTAGTG</u>	Amplifica el promotor de la gliceraleído 3 fosfato deshidrogenasa.
AG P F AG P R	<u>GTACATCGTCTCCTAGAACATCAGGTGGCCTGAGCTGAA</u> <u>TACATGCGTCTCCACCATATCTGGGTGATGTACGATGAAGAGC</u>	Usado en la amplificación del promotor alfa glucosidasa.
GUT1 P F GUT1 P R	<u>GTACATCGTCTCCTAGAACACTTCCTCGGACGGTCAACGGA</u> <u>TACATGCGTCTCCACCATAGTATCTGGACAGGACTGGGGA</u>	Iniciador para amplificar al promotor glicerol quinasa.
IL P 1F IL P 1R	<u>GTACATGGTCTCCTAGAACAGGAAACGAGCTGAACGTAGTCAC</u> <u>TACATGGGTCTCCACCATACTGATGAAACACA-</u> <u>GACGACTGTGA</u>	Oligo utilizado para amplificar el promotor de isocitrato liasa.
LA4D F LA4D R	<u>GTACATGGTCTCCTAGAACAGATGAGGGAGGATGTACAGAGAGG</u> <u>TACATGGGTCTCCACCATGGTACGGATTGTCTGAG</u>	Amplificador para el promotor del gen L-arabinitol-4-deshidrogenasa.
TCP-1-AL- PHA F TCP-1-AL- PHA R	<u>GTACATGGTCTCCTAGAACAGGGTAGAGAGAACAGTTGTGA-</u> <u>GACA</u> <u>TACATGGGTCTCCACCATAATGAATGTGGCAAAGGGATGGA</u>	Oligo diseñado para amplificar a subunidad alfa de la proteína del complejo T.
XD P F XD P R	<u>GTACATGGTCTCCTAGAACAAATGTTCCGATGATCATCATA-</u> <u>TATG</u> <u>TACATGGGTCTCCACCATGATAGCGATAAGAGTAAGTGCT</u>	Secuencia usada para amplificar el gen de xilitol deshidrogenasa.
YFP F1 YFP R2	<u>ACTAGAAGAGACCAAATCAAGGTCTCATGGTGAGCAA-</u> <u>GGGCGAGG</u> <u>AATGTGAGAGAGGCGGGTAATTACTTGTACAGCTCGTC-</u> <u>CATGCC</u>	Iniciadores para amplificar el gen de la proteína verde fluorescente.
GDHT F1 GDHT R1	<u>CGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAATTACCCCGCCTCT-</u> <u>CACAT</u> <u>AGAGCGCGGATAGGATATACTTGTTC</u>	Primers utilizados en la amplificación de la glutamato deshidrogenasa.

Nota: En las secuencias de los oligos se agregaron, en el siguiente orden: bases adicionales (subrayadas), las bases correspondientes a los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción (en negrita), las bases en las que ocurre el corte enzimático (subrayado doble) y, finalmente, las bases complementarias a la secuencia promotora (en cursiva).

Una vez recibidos los oligonucleótidos, se procedió a su hidratación siguiendo las instrucciones del proveedor (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se tomó una alicuota para preparar una disolución a una concentración final de 10 μM.

5.4 Construcción del plásmido modular

Para la construcción del plásmido modular se amplificó el gen de la *YEFP* del plásmido pAG413GPD-ccdB-EYFP utilizando los oligos YFP F1 y YFP R2 (Tabla 4), y el terminador de la glutamato deshidrogenasa (GDH) a partir de gADN de *X. dendrorhous* utilizando los oligos GDHT F1 y GDHT R1 (Tabla 4). Ambas reacciones se realizaron siguiendo las indicaciones del protocolo de PCR de punto final.

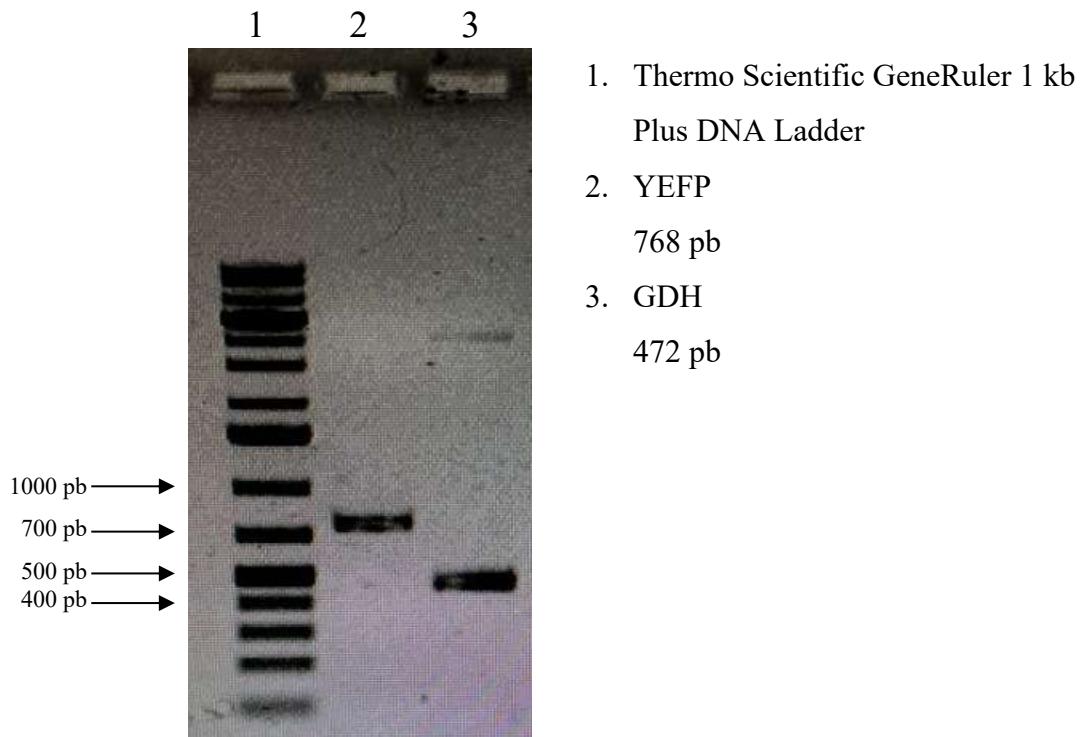


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR: amplificación del gen YEFP y del terminador GDH.

Una vez obtenidos los productos individuales de PCR, estos fueron purificados utilizando el kit DNA Clean & Concentrator de Zymo Research. Posteriormente, se emplearon para una PCR recombinante, con el objetivo de ensamblar el fragmento YEFP-GDH. Para esta reacción se utilizó una mezcla que contenía 1 U de enzima de alta fidelidad, 1 x buffer de reacción, 200 μ M de cada dNTP, 0.5 μ M de cada oligo externo (YEFP F1 y GDHT R1) y cantidades equimolares de los fragmentos purificados.

El producto de la PCR recombinante se visualizó en un gel de agarosa (Figura 8); sin embargo, se observaron bandas inespecíficas. Por esta razón, el fragmento correcto YEFP-GDH fue purificado directamente del gel utilizando el kit Gel Extraction de QIAGEN.

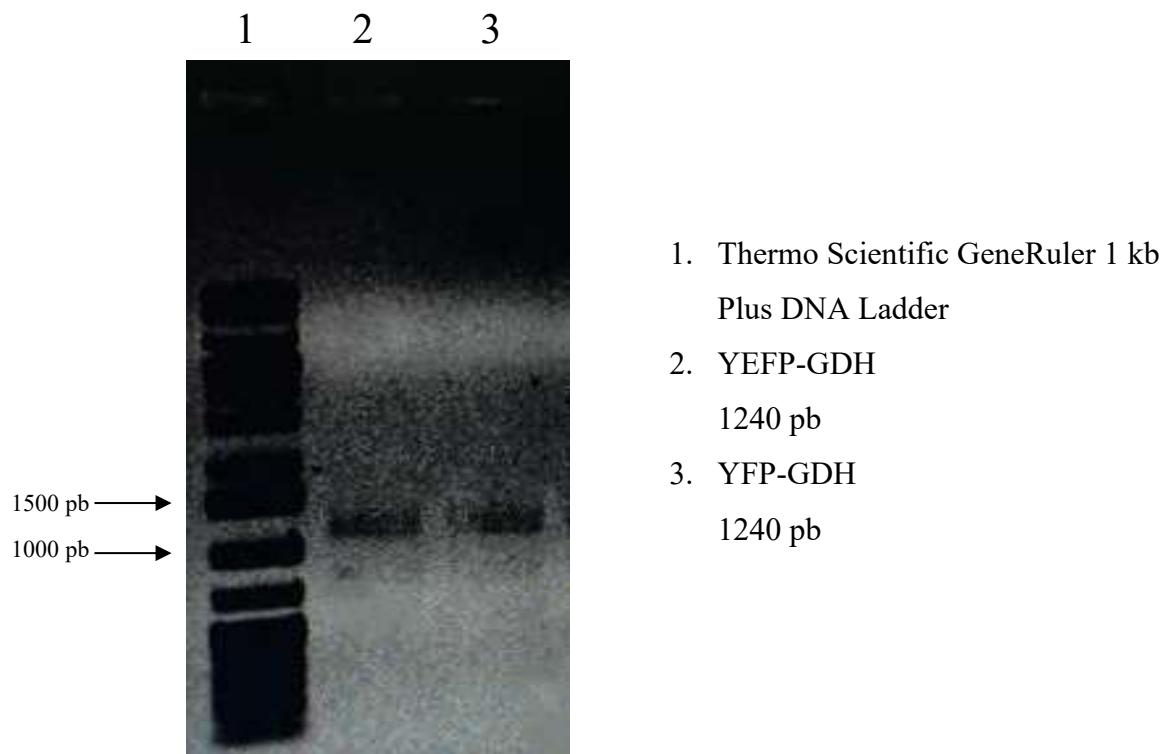


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR recombinante para la unión del gen *YEFP* con el terminador *GDH*. Se observan bandas inespecíficas, por lo que se procedió a purificar el fragmento correcto mediante extracción del gel.

El fragmento YEFP-GDH purificado se ligó en el vector pJET 1.2 blunt, el cual posee como característica distintiva un sistema de selección negativo: si se recirculariza sin inserto, expresa una enzima de restricción letal que elimina la célula huésped después de la transformación. Una alícuota del producto de la ligación fue utilizada para transformar células químicamente competentes de *E. coli* DH5 α . Posteriormente, las células transformadas se sembraron en placas de LB suplementadas con ampicilina. Transcurridas 18 horas de incubación se seleccionaron colonias aisladas para su análisis.

Para identificar las colonias que contenían el plásmido recombinante, se aplicó la técnica de cracking, la cual permite observar diferencias en el tamaño del plásmido por medio de electroforesis. En la Figura 9 se muestran los resultados del análisis, donde se seleccionaron aquellas colonias con un tamaño plasmídico cercano a los 3000 pb, correspondiente al vector con inserto.

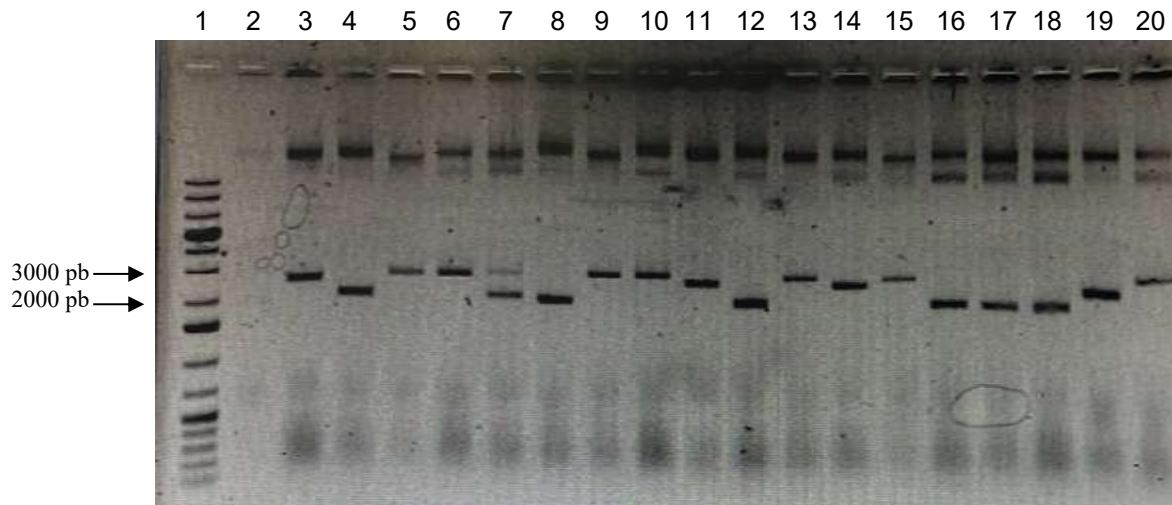
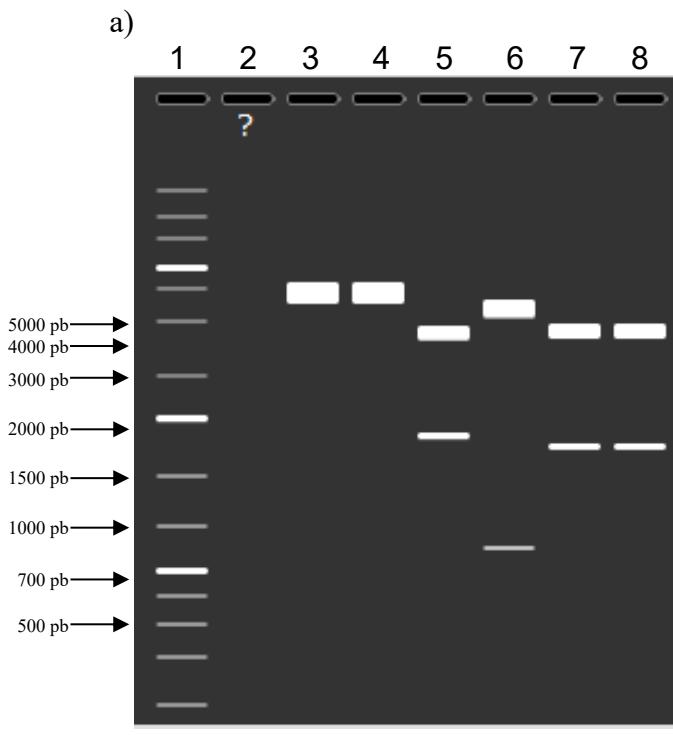


Figura 9. Análisis electroforético por cracking de colonias transformadas con pJET 1.2/YEFP-GDH. Carril 1: marcador de tamaño molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Carril 2: control negativo (pJET 1.2 sin inserto). Carriles 3-20: productos del cracking de 18 colonias transformadas. Las colonias con un patrón cercano a los 3000 pb fueron seleccionadas para análisis posterior.

A partir de los resultados del cracking, se seleccionaron 10 colonias presumiblemente positivas. Se realizó la extracción de ADN plasmídico y se evaluó la presencia y orientación del inserto mediante digestión enzimática. La figura 10 muestra el análisis representativo de dos colonias en las cuales se observa que el patrón obtenido en el gel de electroforesis concuerda con el análisis *in silico*.



1. GeneRuler™ 1 kb Plus DNA

Ladder

2. pJET YFP-GDH 3-5

3. pJET YFP-GDH 3-5 XbaI

4167 bp

4. pJET YFP-GDH 5-3 XbaI

4167 bp

5. pJET YFP-GDH 3-5 PstI

2843 bp

1324 bp

6. pJET YFP-GDH 5-3 PstI

3570 bp

597 bp

7. pJET YFP-GDH 3-5 XbaI + NotI

2926 bp

1241 bp

8. pJET YFP-GDH 5-3 XbaI + NotI

2926 bp

1241 bp

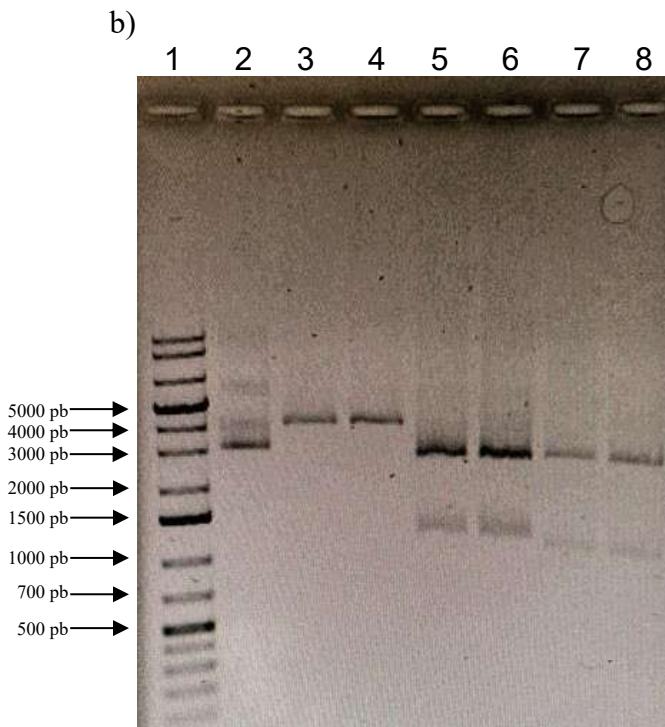


Figura 10. Análisis por digestión enzimática de pJET 1.2 con el inserto YEFP-GDH. a) Simulación *in silico* de las digestiones y las posibles orientaciones del fragmento tras su inserción en el vector. b) Resultado experimental de la digestión de dos colonias seleccionadas.

La digestión de las colonias seleccionadas mostró un patrón de fragmentos coincidente con el análisis *in silico*, confirmando la presencia del inserto *YEFP-GDH* con una orientación de 3'-5'.

De esta manera se comprobó la obtención exitosa del plásmido pJET 1.2-YEFP-GDH, el cual fue utilizado para la subclonación en el plásmido modular pXDrDNA. Sin embargo, tras la secuenciación de este último, se identificó la presencia de sitios de restricción no deseados en las regiones de recombinación homóloga: un sitio de *BsaI* y otro de *BsmBI*. Dado que estos sitios coincidían con los utilizados para clonar promotores mediante oligos diseñados con secuencias de reconocimiento para *BsaI* y *BsmBI*, fue necesario eliminarlos antes de continuar.

El sitio de *BsaI* fue eliminado mediante una estrategia de domesticación, la cual consistió en diseñar un par de oligos que hibridaban en la región del sitio de restricción y que, al ser amplificados por PCR, introducían un cambio de base que eliminaba el sitio de *BsaI*, sustituyéndolo por un sitio de *SpeI*. Posteriormente, se realizó una ligación del producto amplificado para reconstruir el plásmido modificado.

Por otro lado, el sitio de *BsmBI* fue eliminado aprovechando que se encontraba flanqueado por dos sitios de *EcoRI*. Se realizó una digestión con dicha enzima, se purificó el fragmento deseado y se procedió a una recircularización del plásmido. El ADN recombinante fue transformado en *E. coli* y se seleccionaron colonias en las que se había eliminado exitosamente el sitio de *BsmBI* reteniendo únicamente un sitio de *EcoRI*.

El plásmido resultante, libre de los sitios de *BsaI* y *BsmBI* se renombró como pXDrDNA V2. A este se le subclonó el fragmento *YEFP-GDH* utilizando la técnica de polimerización azarosa de fragmentos (PAF). En el primer paso de la técnica, los plásmidos se digirieron con la enzima *NotI*

para generar fragmentos que posteriormente fueron ligados entre sí, formando un polímero de ADN (Figura 11).

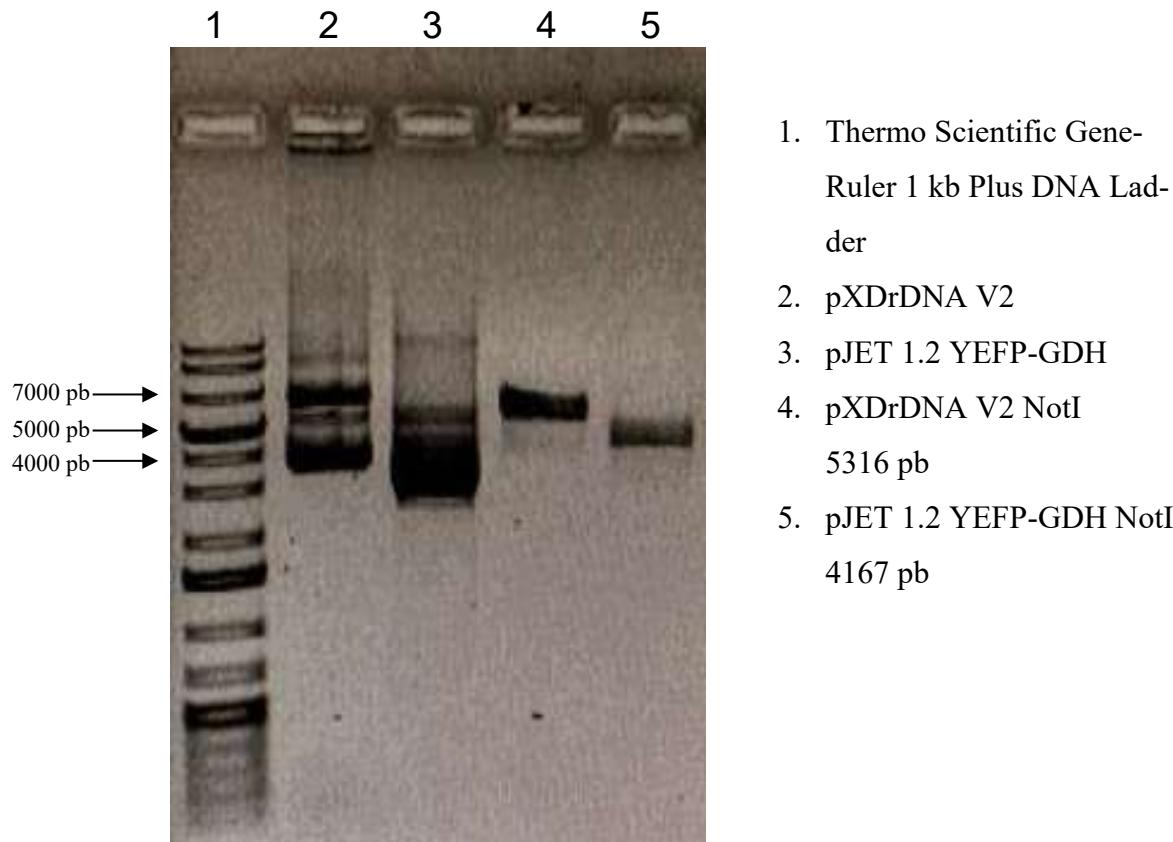


Figura 11. Análisis electroforético del primer paso en la polimerización azarosa de fragmentos (PAF).

Posteriormente, con la enzima PmeI se cortaron los replicones no deseados y se transformó a *E. coli*, se esperó el crecimiento de colonias aproximadamente 18 horas y, posteriormente se resembraron a tubos de ensayo que contenían medio LB suplementado con kanamicina. Después de 16 horas de crecimiento, se tomaron 30 μ l de cultivo para análisis por cracking (Figura 12).

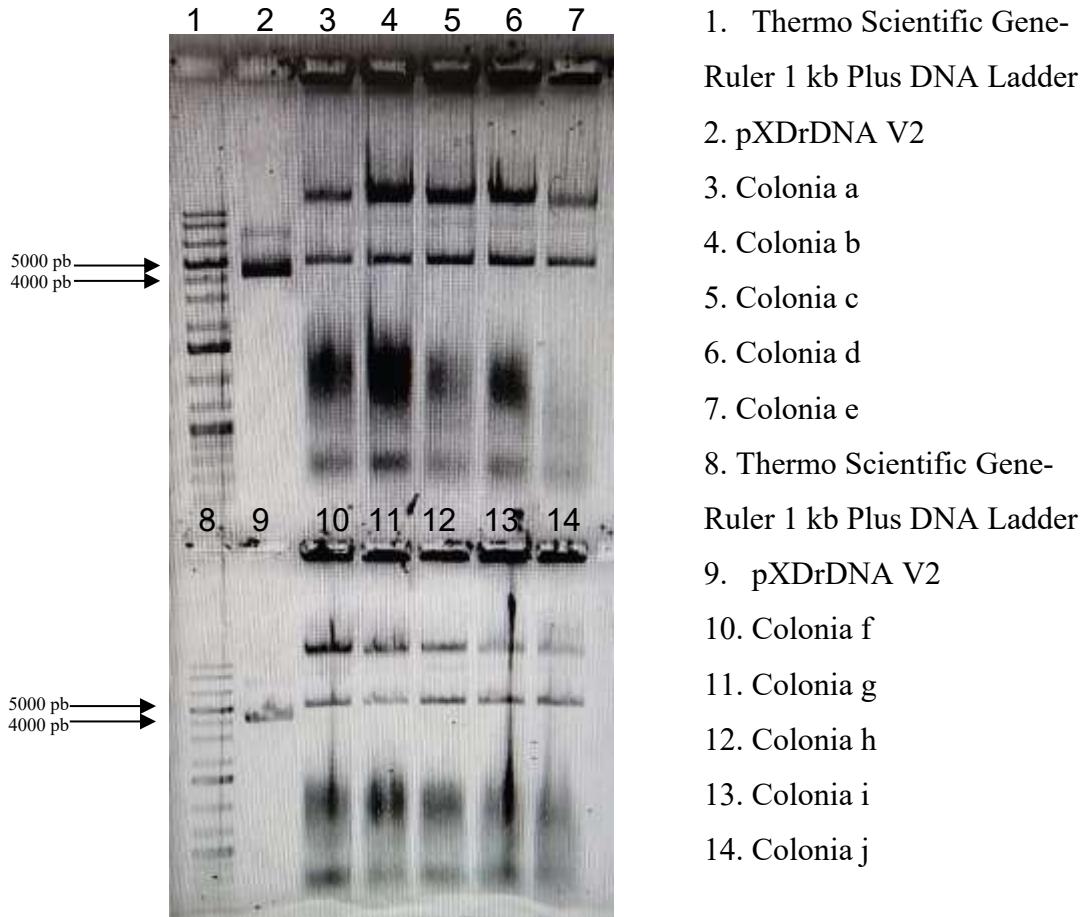


Figura 12. Análisis electroforético de cracking posterior al PAF. Los carriles 2 y 9 corresponden al control negativo. por lo cual se presume que todas las colonias analizadas muestran presencia del inserto.

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante este análisis, todas las colonias presentaron el patrón característico de plásmidos recombinantes, lo que sugiere que contenían el inserto esperado. Con base en ello, se seleccionaron las colonias positivas para proceder a la extracción de ADN plasmídico y su posterior verificación por digestión enzimática.

El ADN plasmídico de diez colonias fue purificado y digerido con la enzima de restricción PstI, que posee un sitio de corte dentro del gen marcado *YEFP*. La digestión permitió verificar la linealización del plásmido, lo cual es indicativo de una inserción correcta del fragmento (Figura 13).

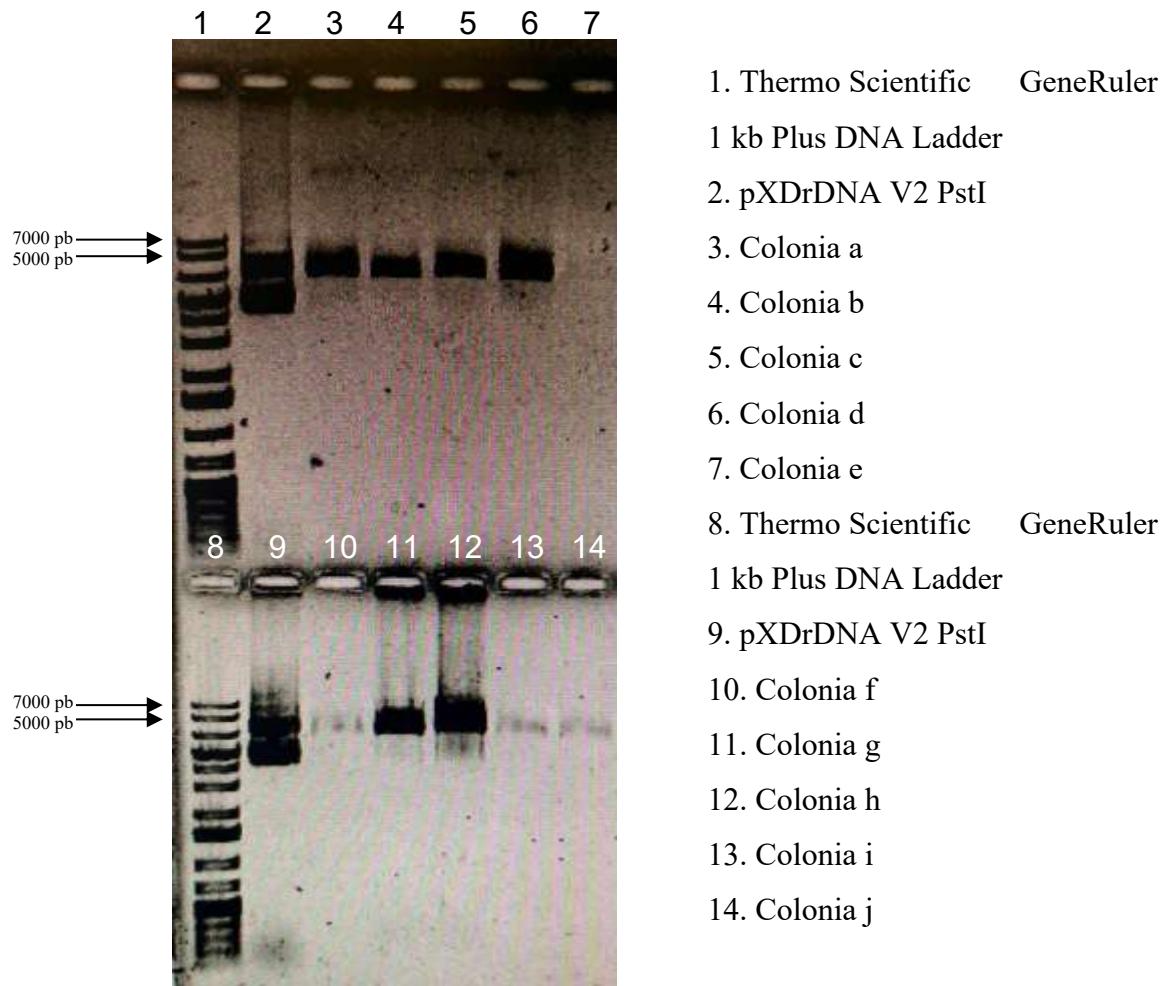
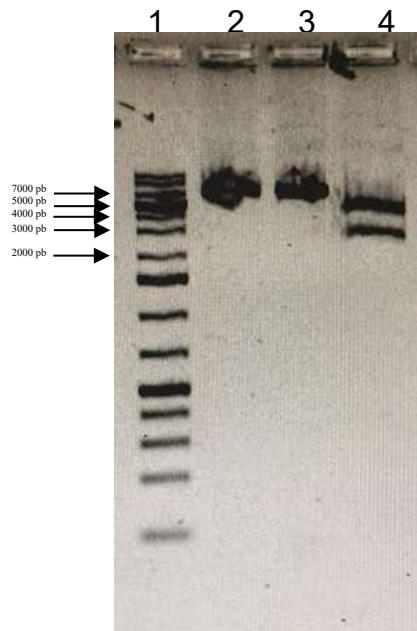


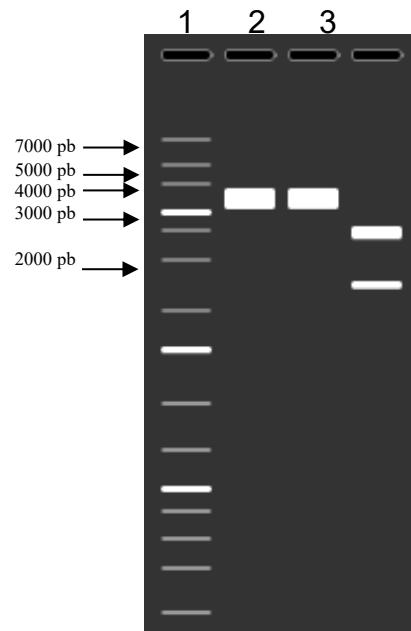
Figura 13. Análisis electroforético de la linealización del plásmido con PstI. Los carriles 7, 10, 13 y 14 presentan baja concentración de ADN, pero muestran fragmentos compatibles con el tamaño del plásmido linealizado. Los controles negativos (carriles 2 y 9) no evidencian corte, lo que confirma la ausencia del inserto.

De las colonias analizadas anteriormente colonia positiva fue seleccionada para realizar digestiones adicionales con las enzimas EcoRI, BsaI, y la combinación EcoRV-SpeI. Estas enzimas permiten evaluar tanto la orientación del inserto como la integridad de los sitios de recombinación homóloga (Figura 14), según los patrones esperados.

a)



b)



1. MW: GeneRuler™
1 kb Plus DNA
Ladder
2. pXDrDNA YEFP
V2
EcoRI
6542 bp
3. pXDrDNA YEFP
V2
BsaI
6517 bp
25 bp
4. pXDrDNA YEFP
V2
EcoRV + SpeI
4080 bp
2462 bp

Figura 14. Digestión múltiple del plásmido recombinante. En la parte a) se encuentra la imagen del gel obtenido que se contrasta con la imagen *in silico* de la imagen b), confirmando la orientación correcta del inserto y la integridad de las regiones flanqueantes.

El plásmido obtenido fue nombrado como pXDrDNA YEFP V2, y se envió a secuenciación con el fin de confirmar que la construcción correspondiera con el diseño previamente generado en SnapGene. A continuación, se esquematiza el vector para identificar los elementos relevantes, incluidos los sitios de restricción BsaI (Figura 15).

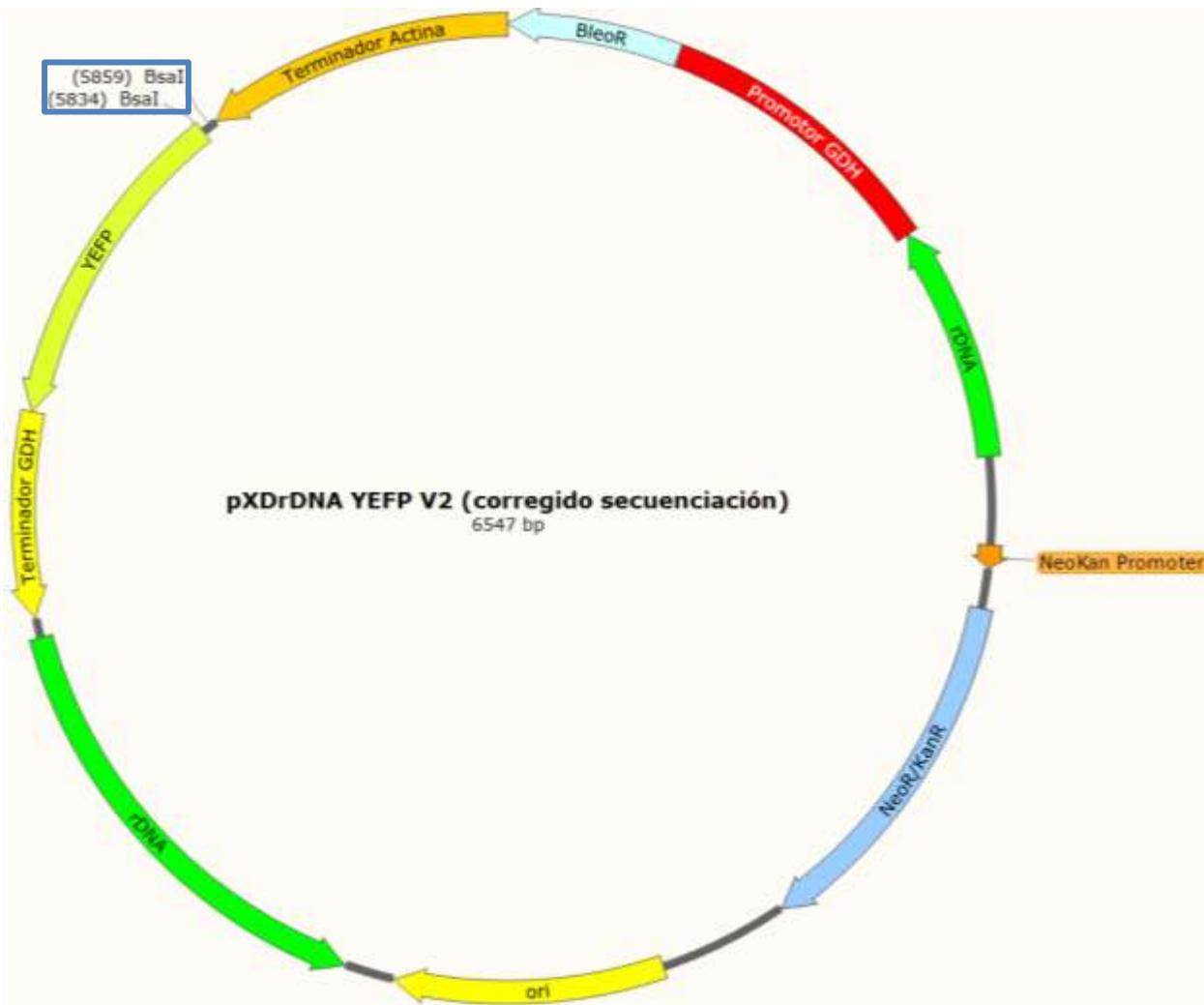


Figura 15. Mapa esquemático del vector de pXDrDNA YEFP V2. Representación del plásmido modular utilizando para ensayar promotores. En el recuadro azul se indican los sitios de restricción BsaI.

Posteriormente, se realizó un alineamiento entre la secuencia obtenida por la empresa de secuenciación y el diseño teórico del plásmido generado en SnapGne, lo anterior con el fin de detectar posibles mutaciones (Figura 16). El análisis mostró un incremento de 5 pares de bases (pb) en los brazos de recombinación homóloga, así como pequeñas variaciones en algunas bases dentro de estas regiones.

Mediante una búsqueda en BLAST, se identificó que los cambios en las secuencias de rDNA se debían únicamente a diferencias en la fuente de información genómica empleada. Se observa una ligera variación en los brazos de recombinación homóloga, la cual corresponde a discrepancias menores dentro de las regiones conservadas. Dichas variaciones se encontraban dentro de lo reportado para el genoma de *X. dendrorhous*.

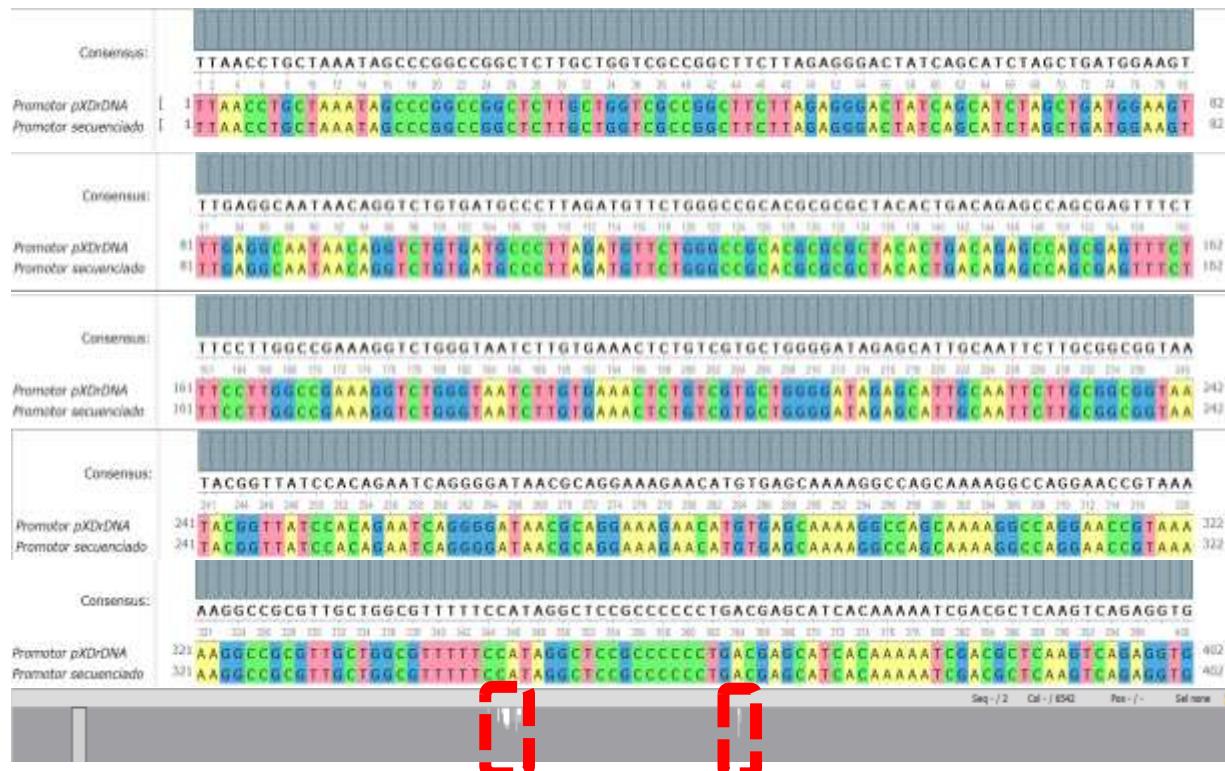


Figura 16. Alineamiento entre el plásmido diseñado y el secuenciado. Comparación realizada en Clustal Omega entre el plásmido diseñado en SnapGene y la secuencia obtenida tras secuenciación.

5.5 Amplificación de secuencias promotoras

Las secuencias promotoras putativas fueron amplificadas mediante reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados previamente. Para ello, se empleó la polimerasa Phusion DNA Pol del ADN genómico de *X. dendrorhous*.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador, siguiendo las condiciones recomendadas por el proveedor. Posteriormente, los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa mostrado en la Figura 17.

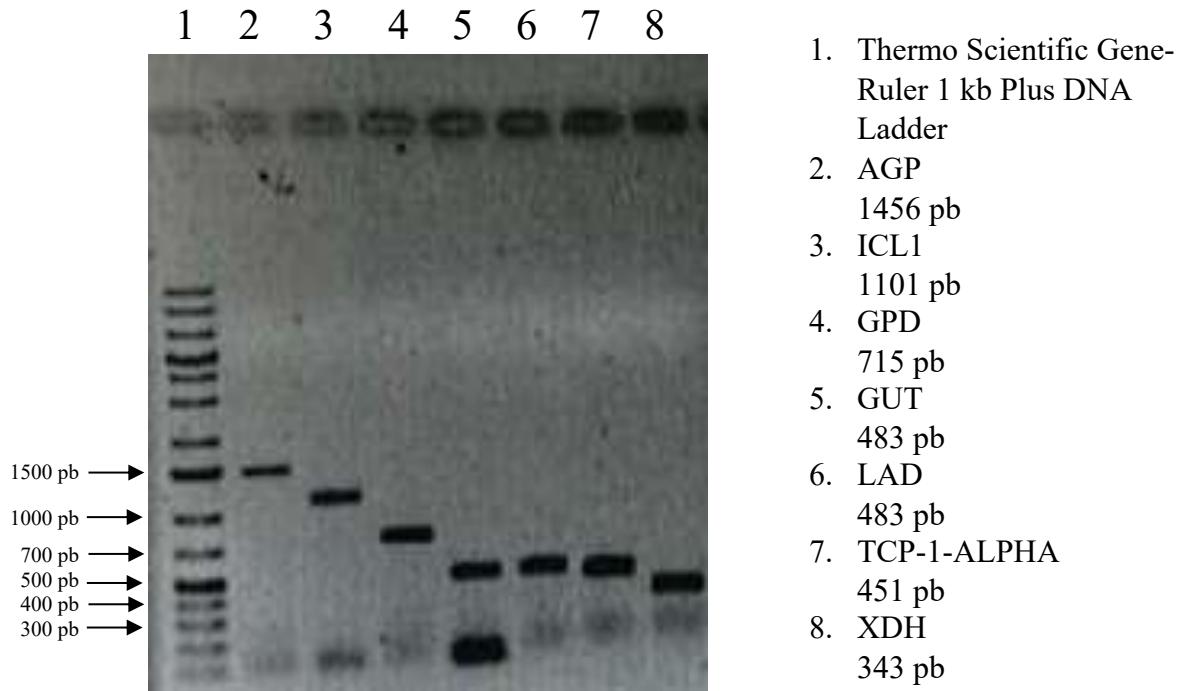


Figura 17. Análisis electroforético de la amplificación de secuencias promotoras.

De acuerdo con los resultados observados en el gel, las bandas obtenidas corresponden al tamaño teórico para cada secuencia promotora. Solo se detectaron algunas bandas en la parte inferior de la imagen, las cuales podrían corresponder a oligonucleótidos remanentes o a productos inespecíficos. Por esta razón, los fragmentos amplificados fueron purificados utilizando un kit comercial DNA Clean & Concentrator (Zymo Research).

Una vez que concluida la construcción del plásmido pXDrDNA YEFP V2, se procedió a clonar las siete secuencias promotoras amplificadas utilizando el sistema de ensamblaje tipo Golden Gate.

5.6 Clonación de secuencias promotoras al plásmido modular

Para insertar las secuencias promotoras en el plásmido modular, se empleó un sistema de ensamblaje tipo Golden Gate. La reacción fue realizada en el termociclador siguiendo el protocolo estándar para este método, y los productos obtenidos se transformaron en *E. coli* para la selección y análisis de colonias.

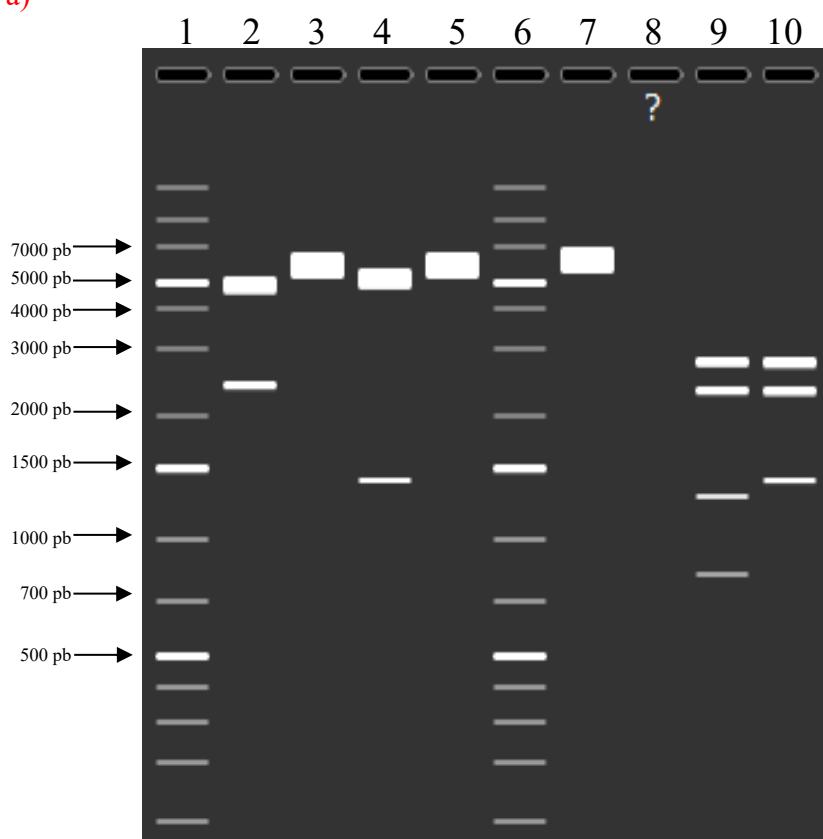
En todos los casos, se seleccionaron enzimas de restricción tipo IIS, como BsaI, que reconocen secuencias específicas fuera de la región promotora, permitiendo su inserción precisa en el vector de destino. Como control, se utilizó el plásmido sin inserto, lo que permitió comparar los patrones obtenidos entre construcciones con y sin la inserción del promotor.

Las clonaciones realizadas incluyeron los promotores GPD, ICL1, LAD, TCP-1-ALPHA y XDH. En todos estos casos, se incorporó dos sitios de reconocimiento para la enzima BsaI en las secuencias promotoras, lo que facilitó su inserción precisa en el plásmido destino mediante el sistema de ensamblaje modular.

5.6.1 Clonación de los promotores ICL, XDH, TCP-1-ALPHA y GPD

Las construcciones generadas para los promotores ICL1, XDH, TCP-1-ALPHA y GPD fueron evaluadas mediante digestiones enzimáticas con SacI, SacII, SalI y BglII, respectivamente.

a)



1. MW: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

2. pXDrDNA V2-ICL1 SacI

5192 bp

2436 bp

3. pXDrDNA YEFP V2 SacI

6542 bp

4. pXDrDNA V2-XDH SacII

5473 bp

1393 bp

5. pXDrDNA YEFP V2 SacII

6542 bp

6. MW: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

7. pXDrDNA V2-TCP-1-ALPHA Sall 6974 bp

8. pXDrDNA YEFP V2 Sall Noncutter

9. pXDrDNA V2-GPD BglIII

2819 bp

2341 bp

1268 bp

822 bp

10. pXDrDNA YEFP V2 BglIII

2819 bp

2341 bp

1382 bp

b)

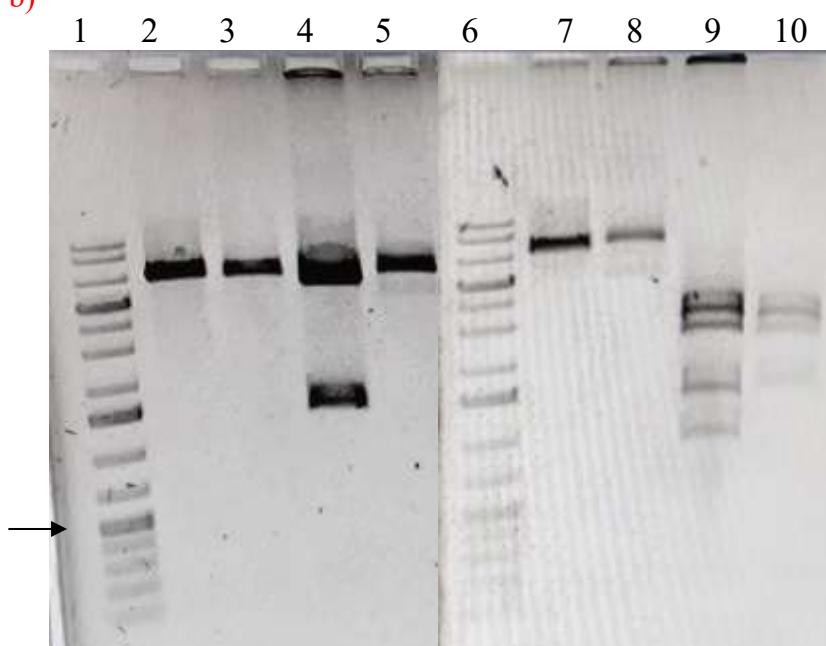


Figura 18. Digestión de las clonaciones de promotores. En la imagen a) se muestra una simulación *in silico* de las digestiones esperadas, mientras que en la imagen b) se observan los resultados obtenidos en el gel de agarosa al 1%.

En los carriles correspondientes en *TCP-1-ALPHA* (carriles 7 y 8 de la imagen b), la digestión presentó un patrón poco claro, por lo que se decidió repetir la clonación y el análisis. Para los demás promotores (*XDH* y *GPD*), las bandas observadas coincidieron con los tamaños esperados, lo que confirmó su correcta inserción en el plásmido.

Para el promotor del gen *ICL1*, las colonias inicialmente analizadas no mostraron bandas compatibles con la inserción esperada. Debido a esto, se seleccionaron y analizaron 28 colonias adicionales. De ellas, dos mostraron un posible patrón compatible con la inserción, por lo que se realizó extracción de ADN plasmídico y una nueva digestión con la enzima *SacI*.

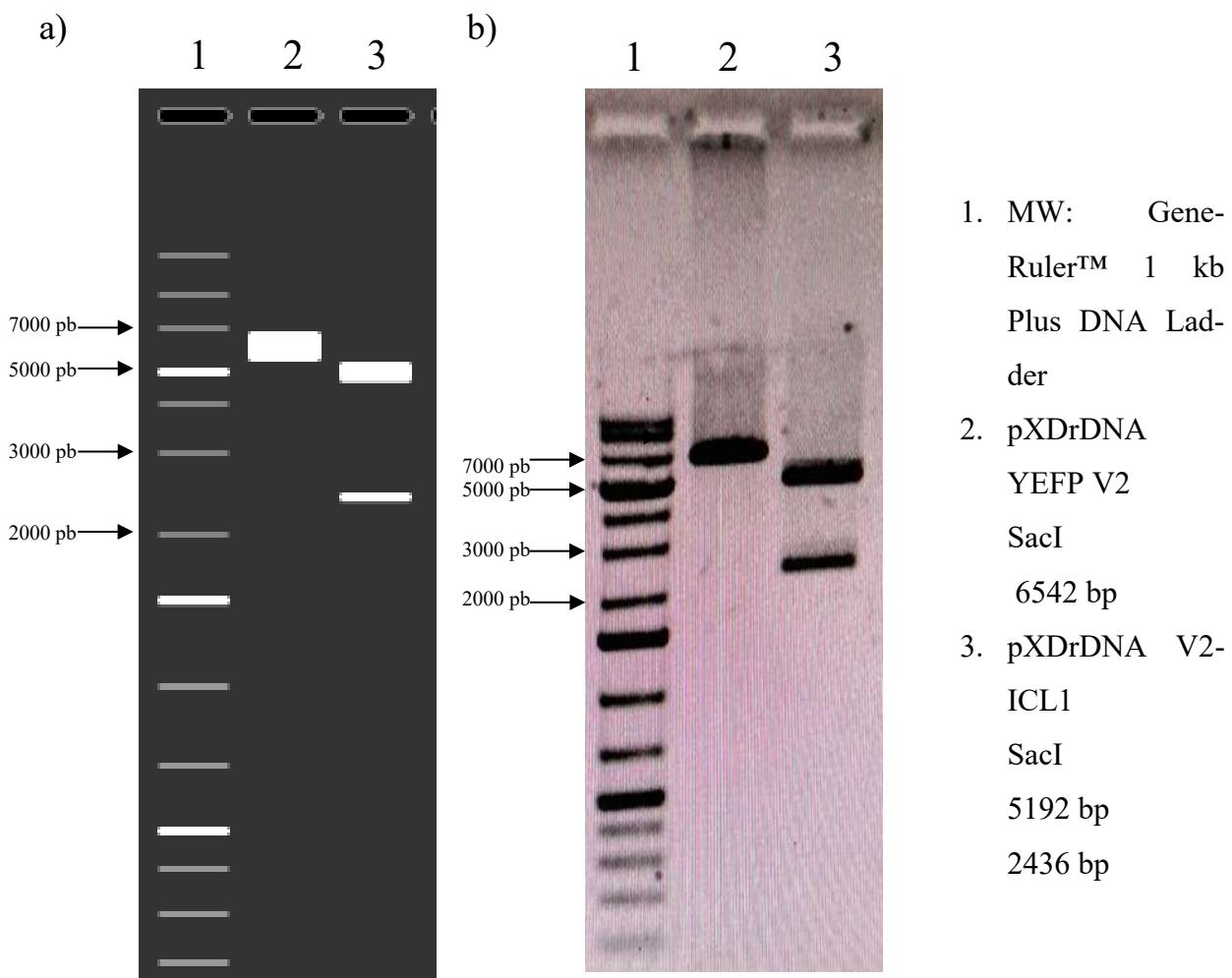


Figura 19. Clonación del promotor del gen isocitrato liasa (ICL1). En la imagen a) del gel *in silico* se observa el patrón esperado tras la digestión: el plásmido sin inserto (control negativo, carril 2) presenta una banda de 6542 pb, mientras que el plásmido con el inserto del promotor (control positivo, carril 3) muestra dos bandas de 5192 pb y 2436 pb, correspondientes a la inserción del fragmento del promotor. En la imagen b), gel experimental de las dos colonias transformadas, solo una presentó el patrón de digestión esperado, lo que confirma la inserción del promotor en la construcción plasmídica.

5.6.2 Clonación del promotor *LAD*

Después del ensamble y la transformación de *E. coli* por el método de cloruro de calcio, no se observaron colonias transformadas. Se planteó entonces la posibilidad de que la secuencia del promotor *LAD* contuviera un sitio de reconocimiento para la enzima BsaI. En este caso, durante el ensamblaje, los plásmidos serían linealizados, impidieran su replicación en *E. coli*.

Con el supuesto anterior, se modificó la mezcla de reacción añadiendo una unidad de ligasa, y se incubó durante tres horas a 30°C antes de realizar una nueva transformación. Esta vez, se observaron colonias en crecimiento. Se realizó un primer análisis por cracking (datos no mostrados) y posteriormente se extrajo ADN plasmídico para confirmar la clonación por digestión enzimática (Figura 20).

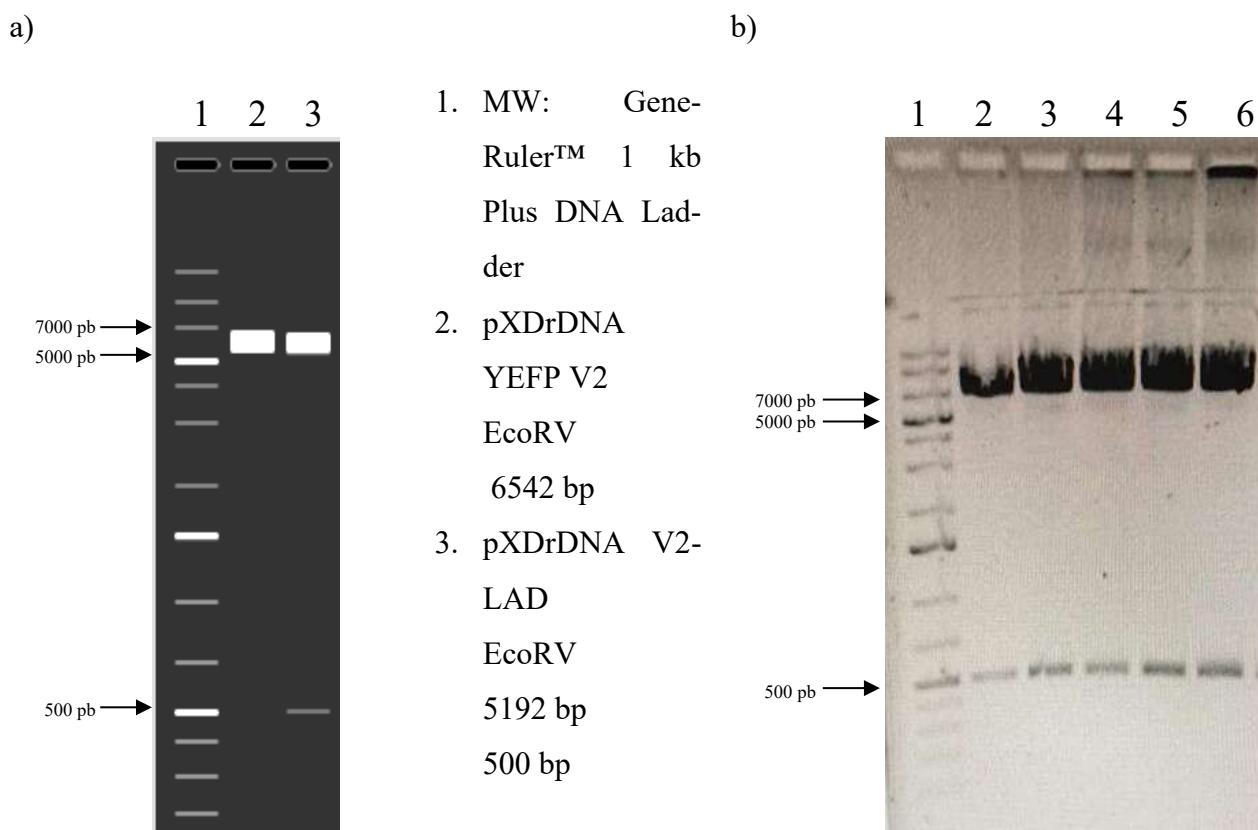


Figura 20. Análisis electroforético de la digestión del plásmido con el promotor *LAD*. En la imagen a), carril 2 muestra la digestión del plásmido pXDrDNA YEFP V2 sin inserto, que presenta

una única banda de 6542 pb tras la digestión con EcoRV. En el carril 3 se observa el plásmido con el promotor *LAD* insertado, mostrando bandas de 5192 pb y 500 pb, correspondientes al patrón esperado. En la imagen b), se observa que todas las colonias analizadas presentan el inserto, lo que confirma una clonación exitosa.

En el caso de los promotores *GUT1* y *AG*, se identificaron sitios de reconocimiento para BsaI dentro de sus secuencias, lo cual impedía el uso del sistema de ensamblaje estándar. Por este motivo, se diseñaron oligonucleótidos que incorporaban sitios de corte para la enzima BsmBI en lugar de BsaI.

Para llevar a cabo la clonación, se digirió por separado el plásmido pXDrDNA YEFP V2 con BsaI y los promotores con BsmBI. Tras la purificación de ambos fragmentos, se realizó la ligación incubando la mezcla durante toda la noche a 22°C. Posteriormente, se tomó una alícuota de la reacción y se transformó a *E. coli* por el método de cloruro de calcio. Finalmente, se seleccionaron y sembraron 24 colonias por cada construcción para su análisis posterior.

5.6.3 Clonación de los promotores GUT1 y AGP

Para confirmar la inserción de los promotores GUT1 y AGP en el vector modular, se analizaron numerosas colonias de ambas construcciones mediante cracking (datos no mostrados). Sin embargo, resultó difícil identificar de forma concluyente cuáles contenían el inserto correspondiente. Por ello, se seleccionaron cuatro colonias para GUT1 y dos colonias para AGP, y se realizaron digestiones enzimáticas para confirmar la clonación (Figura 21).

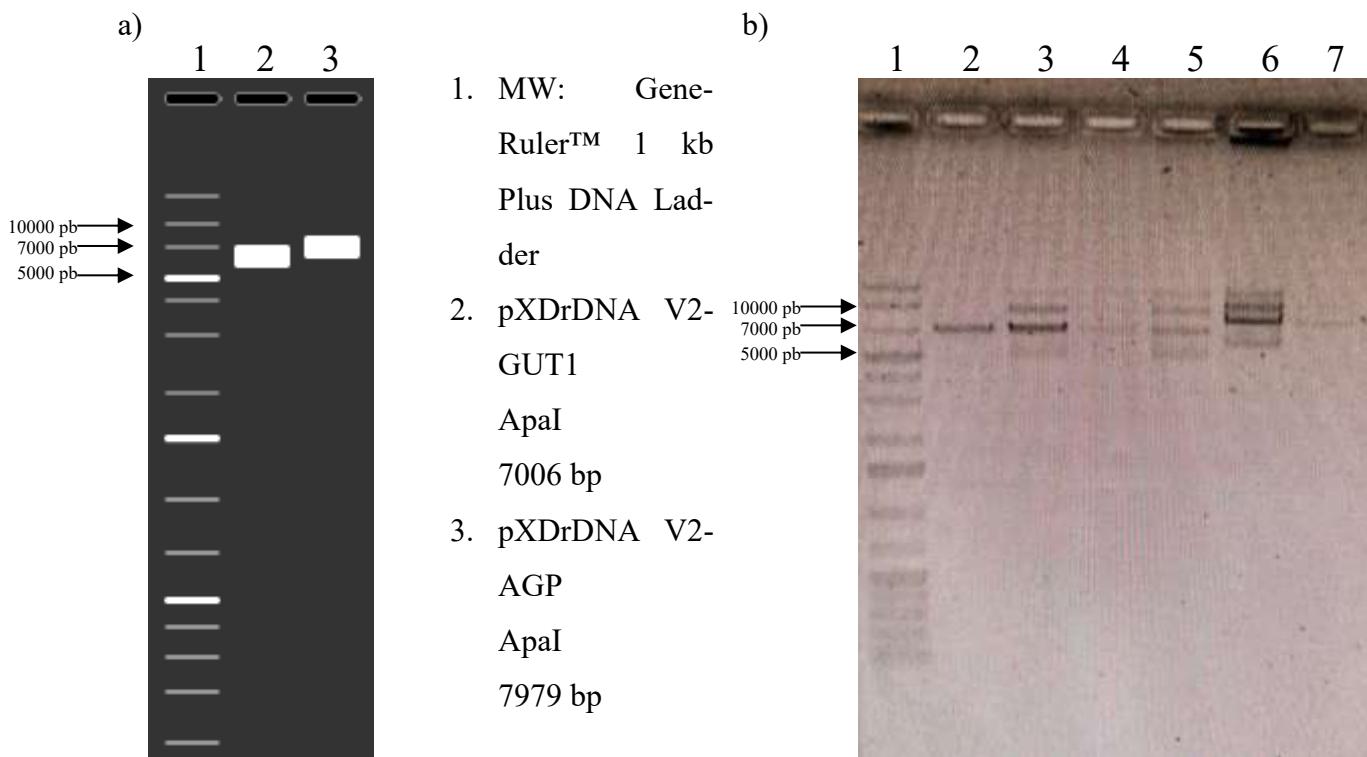


Figura 21. Análisis electroforético de las digestiones de las construcciones con los promotores *GUT* y *AG*. En la imagen a) se muestran los patrones esperados tras la digestión con la enzima ApaI para los plásmidos. En la imagen b), el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles del 2 al 5 corresponden a las construcciones con el promotor *GUT1*, y los carriles 6 y 7 al promotor AGP. Los resultados permitieron confirmar la presencia del inserto en dos colonias para *GUT1* (carriles 2 y 4) y en una colonia para *AG* (carril7).

Una vez confirmadas todas las construcciones mediante digestiones enzimáticas, se analizaron mediante PCR para verificar que las secuencias promotoras habían sido clonadas correctamente en el plásmido XDrDNA YEFP V2. Los resultados de esta verificación se muestran en la Figura 22.

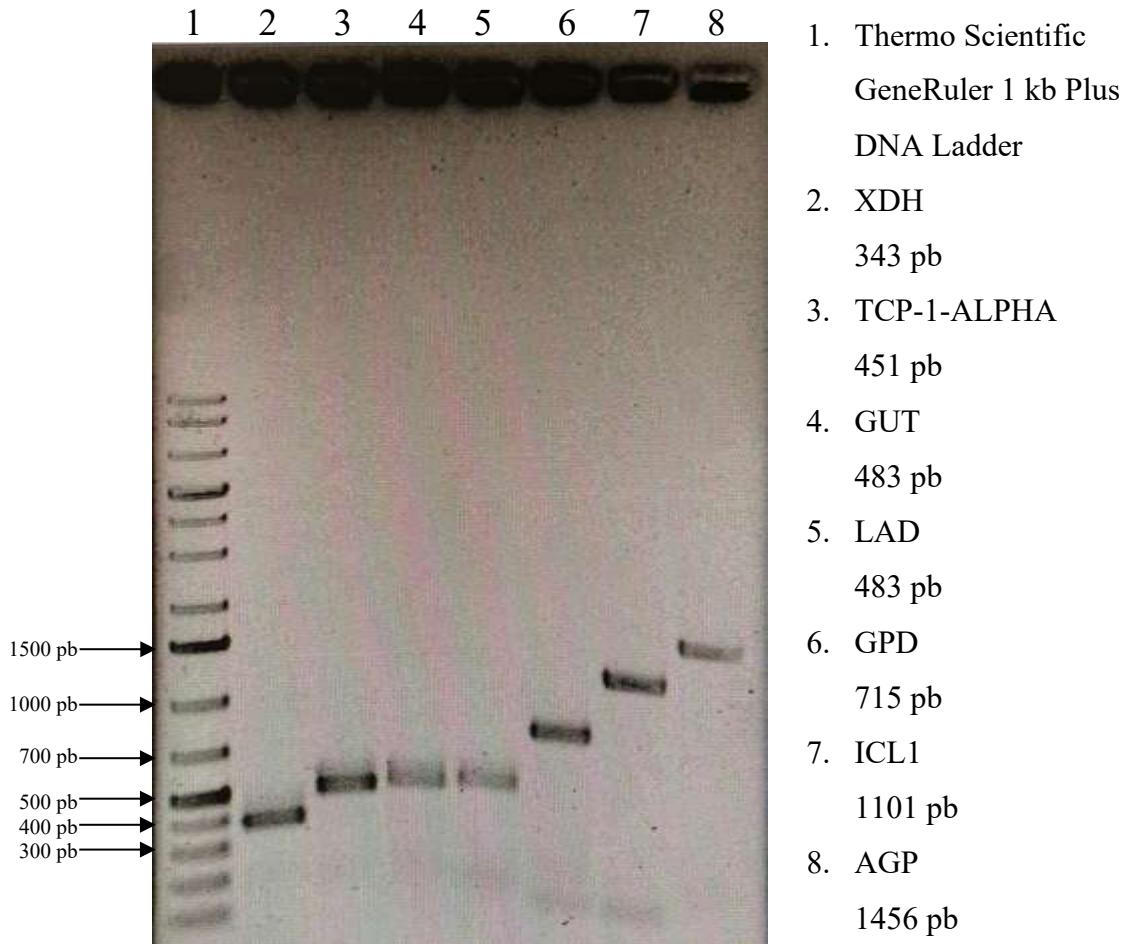


Figura 22. Verificación por PCR de las secuencias promotoras clonadas. Se observa la amplificación específica de los fragmentos correspondientes a cada uno de los promotores insertados, confirmando la integridad y correcta orientación de las construcciones.

5.7 Transformación de *X. dendrorhous*

Para transformar *X. dendrorhous*, se requería una alta concentración de ADN plasmídico (5-10 µg). Por ello, se realizó nuevamente una nueva transformación en *E. coli* con las construcciones previamente validadas, y posteriormente se extrajo ADN plasmídico. Este ADN fue digerido con la enzima EcoRI. Adicionalmente se purificó el DNA digerido por diferentes métodos con el fin

de eliminar sales y concentrar la muestra. Los métodos de purificación incluyeron el kit DNA Clean & Concentrator, diálisis y precipitación con etanol.

Antes de realizar la transformación, se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de zeocina necesaria para inhibir el crecimiento de *X. dendrorhous*, con el fin de establecer condiciones óptimas de selección. Se prepararon placas con diferentes concentraciones de zeocina, manteniendo un volumen constante de medio (10 mL) por placa. Los resultados se resumen a continuación:

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria

Concentración de zeocina	Volumen añadido por placa	Resultado observado
10 µg/ml	1 µL	Crecimiento normal
50 µg/ml	5 µL	Crecimiento parcial
*100 µg/ml	10 µL	Inhibición efectiva
200 µg/ml	20 µL	Inhibición total
300 µg/ml	30 µL	Inhibición total
500 µg/ml	50 µL	Inhibición total

Nota: Se seleccionó la concentración 100 µg/ml como óptima para los ensayos de transformación, ya que permitió una inhibición clara del crecimiento sin ser excesiva. Las concentraciones inferiores no generaban suficiente presión de selección, mientras que las superiores inhibían completamente el crecimiento, incluso en condiciones controladas.

Luego de determinar la CMI se prepararon células competentes de *X. dendrorhous* según el protocolo descrito en la sección de Metodología. Posteriormente, se realizaron intentos de transformación siguiendo las condiciones descritas en apartado 4.6.2. Durante este proceso se evaluaron

diferentes variables, como la concentración de zeocina en las placas de selección y la densidad óptica a la que se cosechaban las células.

A pesar de los ajustes realizados, no se logró obtener transformantes exitosos. Se consideran varios factores que podrían haber influido en este resultado, entre ellos:

- Mal funcionamiento del electroporador.
- Cantidad insuficiente de ADN plasmídico.
- Calidad del ditiotreitol (DTT) en las soluciones de preparación celular.
- Concentración inadecuada de zeocina en el medio de selección.
- Posible efecto negativo de la zeocina en el medio de selección.
- Posible efecto negativo de la linealización del plásmido.

Por limitaciones de tiempo no fue posible evaluar experimentalmente cada una de estas hipótesis.

A pesar de que no se logró transformar exitosamente *X. dendrorhous*, el trabajo realizado contribuye significativamente al desarrollo de un sistema modular de expresión basado en el gen reportero *YEFP*, diseñado para evaluar la actividad de diferentes secuencias promotoras en esta levadura.

Este sistema representa una herramienta valiosa para estudiar la expresión génica en respuesta a diversas condiciones ambientales, incluyendo el uso de sustratos no fermentables, estrés térmico, y potencialmente otros factores como cambios en el pH, presencia de inductores específicos o limitaciones nutricionales. El conocimiento generado puede aplicarse para lograr un control más preciso de rutas metabólicos de interés industrial, como la producción de astaxantina y otros metabolitos relevantes.

En conjunto, este trabajo sienta las bases para futuras investigaciones orientadas a optimizar la expresión génica en *X. dendrorhous* o especies relacionadas, así como para la caracterización de promotores con aplicaciones biotecnológicas.

Capítulo 6

Conclusión y

perspectivas

Este trabajo permitió identificar seis secuencias promotoras, seleccionadas tras la evaluación de aproximadamente doce genes. La mitad de las secuencias fueron descartadas luego de ensayos en distintos medios de cultivo y con diversas fuentes de carbono, debido a que algunas no eran metabolizadas por la levadura. Este criterio fue clave para asegurar que la expresión observada dependiera realmente de la actividad promotora y no de la disponibilidad metabólica del inductor.

Para la amplificación de las secuencias promotoras, se diseñaron oligonucleótidos considerando parámetros fundamentales, como una temperatura de fusión de $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$, lo cual aseguró una hibridación eficiente y condiciones compatibles entre pares. Este objetivo se logró utilizando oligos de aproximadamente 20 pares de bases. Si bien este aspecto no representa un hallazgo en sí mismo, fue esencial para el éxito de la clonación y la posterior validación funcional de los promotores.

Como base para el plásmido modular se utilizó un esqueleto diseñado en un trabajo anterior. Se planeó insertar el casete YFP-GDH en orientación 5'-3', como se muestra en la figura 11 (sección 5.4), con el objetivo de minimizar falsos positivos en la evaluación de la expresión. Sin embargo, tras varios intentos, no se logró esta orientación específica. A pesar de ello, se decidió continuar con la construcción, asumiendo que la orientación no comprometería significativamente la expresión de la proteína fluorescente. Este punto deberá ser validado experimentalmente en estudios futuros.

Para la transformación de *X. dendrorhous*, se utilizaron dos métodos de preparación de ADN: purificación y diálisis. Esta última resultó más eficaz en términos de rendimiento, aunque con un mayor riesgo de pérdida total de la muestra, lo cual podría obligar a repetir el proceso completo. Esta observación representa una perspectiva concreta para optimizar protocolos de transformación en futuras aplicaciones.

Por razones de tiempo, no fue posible completar la electrotransformación por lo que se deja abierta la posibilidad de continuar este trabajo. Este paso pendiente es particularmente relevante considerando las aplicaciones biotecnológicas del sistema, orientadas a la sobreexpresión de metabolitos de interés comercial, tales como pigmentos, lípidos y enzimas. Entre estos compuestos, destaca la astaxantina, una molécula producida naturalmente por *X. dendrorhous*, reconocida por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, neuroprotectoras y cardiovasculares.

En resumen, se identificaron seis secuencias promotoras inducibles con potencial para regular la expresión génica en *X. dendrorhous*. Estas herramientas podrían ser integradas en cepas productoras, permitiendo el diseño de sistemas de expresión más eficientes y regulables. Su implementación facilitaría el desarrollo de cepas optimizadas para la biosíntesis dirigida de compuestos de alto valor comercial.

Futuras investigaciones podrían enfocarse en caracterizar promotores sensibles a otros tipos de estrés (osmótico, oxidativo, térmico) o a inductores químicos específicos, ampliando así el repertorio de herramientas genéticas disponibles para esta levadura no convencional.

Adicionalmente, la combinación de estos promotores con técnicas de edición genética permitiría diseñar circuitos metabólicos sintéticos regulados temporal y espacialmente. Esto abriría nuevas posibilidades para mejorar la producción de pigmentos, lípidos u otras moléculas bioactivas. El sistema también podría adaptarse para evaluar promotores en otras levaduras no convencionales en el campo de la biología sintética.

Bibliografía

1. AcademiaLab. (s. f.). Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. <https://academia-lab.com/encyclopedia/gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa/>
2. Ahuatzi, D., Herrero, P., De La Cera Martínez, T., & Moreno, F. S. (2004). The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is MIG1-dependent. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14440-14446. <https://doi.org/10.1074/jbc.m313431200>
3. Alcaíno, J., Bravo, N., Córdova, P., Marcoleta, A. E., Contreras, G., Barahona, S., Sepúlveda, D., Fernández-Lobato, M., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2016). The Involvement of Mig1 from *Xanthophyllomyces dendrorhous* in Catabolic Repression: An Active Mechanism Contributing to the Regulation of Carotenoid Production. *PLoS ONE*, 11(9), e0162838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162838>
4. Alemcha. (s. f.). *Cinetica Enzimatica Equipo4*. Scribd. <https://es.scribd.com/document/681652027/Cinetica-Enzimatica-Equipo4>
5. Alves, S.L. (2010). Genômica do metabolismo de maltotriose em *saccharomyces cerevisiae*: o papel determinante do gene AGT1 [Tesis de Doctorado]. Universidad de São Paulo, Instituto de Ciencias Biomédicas. <https://doi.org/10.11606/t.87.2010.tde-29042010-105556>
6. Aste, A.I. (2023). Producción de xilanasa en un sistema de expresión constitutivo [Tesis de Ingeniería Civil en Biotecnología]. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Química, Biotecnología y Materiales.
7. Bae, B., Sullivan, R. P., Zhao, H., & Nair, S. K. (2010). Structure and Engineering of l-Arabinitol 4-Dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *Journal Of Molecular Biology*, 402(1), 230-240. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.033>
8. Barredo, J. L., García-Estrada, C., Kosalková, K., & Barreiro, C. (2017). Biosynthesis of astaxanthin as a main carotenoid in the heterobasidiomycetous yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Fungi*, 3(3), 44. <https://doi.org/10.3390/jof3030044>
9. Bartolo, Y. (2017). Construcción de un circuito genético que promueva controladamente la lisis celular de *Pichia pastoris* [Tesis de Doctorado]. Centro de Investigación y de estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
10. Belmar, R., & Alfonso, V. (2018). Microorganismos extremófilos. Psicrófilos y sus mecanismos de adaptación. *Nature*, 409, 1092-1101.

11. Bernal, M. P., Remedios, D. A., Pérez, O. V., Rigo, M. D., & Ramos, R. (2016). Assessment three constitutive promoters for GUS expression in rice (*Oryza sativa* L., var. J-104). Revista Colombiana de Biotecnología. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57716>
12. Borghi, L. (2010). Sistemas de Expresión Génica Inducible para Plantas. En: Hennig, L., Köhler, C. (eds) *Plant Developmental Biology. Métodos en Biología Molecular*, vol 655. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-765-5_5
13. Bresso, E.G. (2022). Biogénesis y Actividad de miRNAs en *Arabidopsis thaliana* [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. <http://hdl.handle.net/2133/25674>
14. Breitenbach, J., Pollmann, H., & Sandmann, G. (2019). Genetic modification of the carotenoid pathway in the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*: Engineering of a high-yield zeaxanthin strain. *Journal of Biotechnology*, 289, 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.11.019>
15. Butt, T. R., Sternberg, E. J., Gorman, J. A., et al. (1984). *Gene*, 31(2), 297–305.
16. Cheng, Q., & Michels, C. A. (1991). MAL11 and MAL61 encode the inducible high-affinity maltose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Of Bacteriology*, 173(5), 1817-1820. <https://doi.org/10.1128/jb.173.5.1817-1820.1991>
17. Cifuentes, V. (2002). Estudio de la expresión de genes de la carotenogénesis en *Xanthophyllomices dendrorhous* (ex *Phaffia rhodozyma*). <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/187444>
18. Clínica Universidad de Navarro (s.f.). *Qué es la glutamato deshidrogenasa. Diccionario médico*. <https://www.cun.es. https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/glutamato-deshidrogenasa#:~:text=La%20glutamato%20deshidrogenasa%20es%20una%20enzima%20clave,oxidativa%20del%20glutamato%20para%20formar%20%CE%B1-cetoglutarato%20y%20amonio.>
19. Cortes, J. (2012) Búsqueda de promotores en el genoma de la caña de azúcar [Tesis de Maestría en Ciencias Básicas, con especialidad en Biotecnología]. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias.

20. Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y., & Madden, K. R. (1985). *Pichia pastoris* as a Host System for Transformations. *Molecular And Cellular Biology*, 5(12), 3376-3385. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.12.3376-3385.1985>
21. De Felippes, F. F., Wang, J., & Weigel, D. (2012). MIGS: miRNA-induced gene silencing. *Plant Journal*, 70(3), 541-547. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2011.04896.x>
22. De la Riva, G. A., Colli, J. G., & Juárez G. (2015). Clonación y caracterización del gen codificador del transportador de xylose de *Debranomyces hansenii* en *E.coli*. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 2-4: 561-567.
23. Engel, C., Sainsbury, S., Cheung, A. C. M., Kostrewa, D., & Cramer, P. (2013). RNA Polymerase I Structure and transcription regulation. *Nature*, 502(7473), 650-655. <https://doi.org/10.1038/nature12712>
24. *Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP) nuclear localization*. (s. f.). Nikon's MicroscopyU. <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/nikon-fluorescence-filter-sets/yellow-fluorescent-protein-excitation-yfp-hyq/enhanced-yellow-fluorescent-protein-eyfp-nuclear-localization>
25. Fariás-Álvarez, L., Gschaedler-Mathis, A., Sánchez-Ortiz, A., Femat, R., Cervantes-Martínez, J., Arellano-Plaza, M., Zamora-Pedraza, C., Amillastre, E., Ghommidh, C., & Herrera-López, E. J. (2018). Xanthophyllomyces dendrorhous physiological stages determination using combined measurements from dielectric and Raman spectroscopies, a cell counter system and fluorescence flow cytometry. *Biochemical Engineering Journal*, 136, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.04.016>
26. Gancedo, C., Flores, C., & Gancedo, J. M. (2016). The expanding landscape of moonlighting proteins in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 765-777. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00012-16>
27. García, A. (2012). Estudio de la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous* [Tesis de Maestría]. Universidad de León, Departamento de Biología Molecular.
28. García, A. J. (2022). Producción mejorada de polihidroxialcanoatos en *Cupriavidus necator* utilizando una nueva estrategia de ingeniería metabólica [Tesis de Maestría]. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional, Unidad Zacatenco. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/4206/SSIT0019248.pdf?sequence=1>

29. García, S. (2013). Análisis de los mecanismos de respuesta a bajas temperaturas y a estrés del retículo endoplásmico [Tesis de Doctorado]. Universidad de Valencia, Departamento de Biotecnología. <http://hdl.handle.net/10550/32130>
30. Gelambi, M. (2023). *ADN recombinante*. Lifeder. <https://www.lifeder.com/adn-recombinante/>
31. Gimeno, M. (2019) Estudio estructural de la B-fructofuranosidasa de *Xanthophyllomyces dendrorhous* y su empleo para la producción de oligosacáridos prebióticos y otros derivados fructosilados [Tesis de Doctorado en Biociencias Moleculares]. Universidad Autónoma de Madrid. <http://hdl.handle.net/10486/687350>
32. Giner, M., Montoya, M., Vázquez, M., Miranda, C., Miranda, M., & Pérez-Cano, R. (2016). *¿Qué son los microARNs?: posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica*. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1889-836X2016000100007
33. Gómez, M., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2021). The SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) pathway: a regulatory bridge between carotenogenesis and sterol biosynthesis in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research*, 54(1). <https://doi.org/10.1186/s40659-021-00359-x>
34. Gonzalez, C.A. (2010) Biología molecular. México: UAM, Unidad Cuajimalpa, División de Ciencias Naturales e Ingeniería, Departamento de Ciencias Naturales. ISBN: 978-607-477-441-2
35. González-Salinas, S., Trujillo Pérez, V. C., & Apáez Villarreal, L. J. (2018). Transcripción génica. TEPEXI Boletín Científico De La Escuela Superior Tepeji Del Río, 5(10). <https://doi.org/10.29057/estr.v5i10.3307>
36. Grauslund, M., & Rønnow, B. (2000). Carbon source-dependent transcriptional regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene, GUT2, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal Of Microbiology*, 46(12), 1096-1100. <https://doi.org/10.1139/w00-105>
37. Hara, K. Y., Morita, T., Mochizuki, M., Yamamoto, K., Ogino, C., Araki, M., & Kondo, A. (2014a). Development of a multi-gene expression system in *xanthophyllomyces dendrorhous*. *Microbial Cell Factories*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0175-3>

38. Hara, K. Y., Morita, T., Endo, Y., Mochizuki, M., Araki, M., & Kondo, A. (2014b). Evaluation and screening of efficient promoters to improve astaxanthin production in *xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6787-6793. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5727-2>
39. Herrera, A.L. (2019) Respuesta Fisiológica de Cepas de *Pichia Pastoris* a Condiciones de Sobreproducción de Proteínas Heterólogas Reguladas por el Promotor Constitutivo Gap [Tesis de Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología]. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.
40. J. M., F. A., V. A. & B. B. (2007) Efecto de la sobreexpresión del gen dur1,2 en dos cepas vínicas de levadura para la reducción de urea en vinos. International Symposium Microbiology and Food Safety of Wine “Microsafetywine”. España, 20-21.
41. Johnson, E. A., & Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast Biotechnology. En Elsevier eBooks (pp. 21-44). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52149-1.00003-3>
42. Jordá, T., & Puig, S. (2020). Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 11(7), 795. <https://doi.org/10.3390/genes11070795>
43. Krijger, J., Baumann, J., Wagner, M., Schulze, K., Reinsch, C., Klose, T., Onuma, O. F., Simon, C., Behrens, S., & Breunig, K. D. (2012). A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in *Kluyveromyces lactis*. *Microbial Cell Factories*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-112>
44. Ladunga, I. (2010). Computational Biology of transcription factor binding. Humana Press.
45. Lee, F. J., Lin, L. W., & Smith, J. A. (1990). Nucleotide sequence of the ACS1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 18(15), 4620. <https://doi.org/10.1093/nar/18.15.4620>
46. Liang, S., Bipatnath, M., Xu, Y., Chen, S., Dennis, P. P., Ehrenberg, M., & Bremer, H. J. (1999). Activities of constitutive promoters in *Escherichia coli* 1 Edited by D. E. Draper. *Journal of Molecular Biology*, 292(1), 19-37. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3056>
47. Li, L., Yu, Z., Zhao, D., Ren, Y., Hou, H., & Xu, Y. (2021). Structure of human RNA polymerase III elongation complex. *Cell Research*, 31(7), 791-800. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00472-2>
48. Lynch, M. (2005). The Origins of Eukaryotic Gene Structure. *Molecular Biology And Evolution*, 23(2), 450-468. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj050>

49. Liu, X., Driskell, R. R., Luo, M., Abbott, D., Filali, M., Cheng, N., Sigmund, C. D., & Engelhardt, J. F. (2004). Characterization of LEF-1 promoter segments that facilitate inductive developmental expression in skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 123(2), 264-274. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202x.2004.23201.x>
50. Liu, Y., Koh, C. M. J., Sun, L., Hlaing, M. M., Du, M., Peng, N., & Ji, L. (2012). Characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene RtGPD1 and development of genetic transformation method by dominant selection in oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 97(2), 719-729. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4223-9>
51. Lucero, M.P. (2015) Inactivación del transportador de maltosa en levadura: mecanismos de su degradación [Tesis de Doctorado]. Universidad Complutense de Madrid. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=15654>
52. Marín, M.A. (2019) Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (kLa) y potencia gaseada volumétrica (Pg/V) como criterios de escalamiento del bioprocreso para la producción de dextranasa recombinante en Pichia pastoris [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Departamento de Ingeniería Bioquímica. <http://hdl.handle.net/11317/1728>
53. Martínez, A. (2018). Efecto del cobre en la producción de carotenoides por Phaffia rhodozyma [Tesis de Doctorado en Ciencias, en la Especialidad de Biotecnología]. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1383/SSIT0015652.pdf?sequence=1>
54. Martínez, F. (2010). Adaptación a estrés osmótico en *Saccharomyces cerevisiae* : Caracterización genómica de factores de transcripción involucrados y represión de la biosíntesis de ergosterol [Tesis de Doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Biotecnología. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/9311/tesisUPV3446.pdf?sequence=1>
55. McCoy, M. (1999) Astaxanthin market a hard one to crack. *Chem. Eng. News.* 77(14):15-17.
56. Méndez, J. (1999) Biotecnología Aplicada. Elfos Scientia. 16:75-82. ISNN: 0684-4551
57. Mira, P. J. (2021). *ARN polimerasa: Definición, función y tipos - El Gen Curioso*. El Gen Curioso. <https://www.elgencurioso.com/diccionario/arn-polimerasa/>

58. National Human Genome Research Institute, (2025a). *Ácido desoxirribonucleico (ADN)*. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/%C3%81cido-desoxirribonucleico-ADN>
59. National Human Genome Research Institute, (2025b). *ARN (Ácido ribonucleico)*. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/%C3%81cido-ribonucleico-ARN>
60. National Human Genome Research Institute, (2025c). *ARN mensajero (ARNm)*. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ARN-mensajero-ARNm>
61. National Human Genome Research Institute, (2025d). *Promotor*. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Promotor>
62. Nakagawa, Y., Sakumoto, N., Kaneko, Y., & Harashima, S. (2002). MGA2P is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(3), 707-713. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6507>
63. NCBI (s.f.). *National Center for Biotechnology Information*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
64. Park, S., Yi, N., Kim, Y. S., Jeong, M., Bang, S., Choi, Y. D., & Kim, J. (2010). Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants. *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2459-2467. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq076>
65. Pavlik, P., Simon, M., Schuster, T., & Ruis, H. (1993). The glycerol kinase (GUT1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Current Genetics*, 24(1-2), 21-25. <https://doi.org/10.1007/bf00324660>
66. Pilar, H. E. E., & De, B. F. D. (1996). *Regulación transcripcional y post-traduccional de la isocitrato liasa de Saccharomyces cerevisiae*. Universidad de Oviedo. <http://hdl.handle.net/10651/14028>
67. Ponomarenko, M., Mironova, V., Gunbin, K. & Savinkova, L. (2013) Hogness Box. Elsevier Inc, 2, 954.
68. Potenza, C., Aleman, L. & Sengupta, C. (2004) Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. In *Vitro Cell Dev Biol.*, 40 (1), 1-22.
69. Puig, R. P. (2022). *ADN*. Lifeder. <https://www.lifeder.com/adn/#:~:text=El%20ADN%20%28%C3%A1cido%202>

- %E2%80%99-desoxi-5%E2%80%99-ribonucleico%29%20es%20una%20macro-mol%C3%A9cula%20formada,mon%C3%B3meros%20unidos%20lineal-mente%2C%20a%20los%20que%20llamamos%20nucle%C3%B3tidos
70. Qin JY, Zhang L, Clift KL, Hulur I, Xiang AP, et al. (2010) Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. PLoS ONE 5(5): e10611. doi:10.1371/journal.pone.0010611
71. Qin, X., Qian, J., Yao, G., Zhuang, Y., Zhang, S., & Chu, J. (2011). GAP Promoter Library for Fine-Tuning of Gene Expression in *Pichia pastoris*. Applied And Environmental Microbiology, 77(11), 3600-3608. <https://doi.org/10.1128/aem.02843-10>
72. Raj, S. B., Ramaswamy, S., & Plapp, B. V. (2014). Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis. Biochemistry, 53(36), 5791-5803. <https://doi.org/10.1021/bi5006442>
73. Rangel, Y.A. (2020) Evaluación de la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous* a partir de sacarificados de bagazo de caña fructosilados [Tesis de Maestro en Ciencias, en la Especialidad de Biotecnología]. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/2550/SSIT0016309.pdf?sequence=1>
74. Ramírez, L. R. (2013). Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisoria con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*, 17(1), 49-55.
75. Redruello, M.B. (2000) Caracterización funcional del promotor del gen acr1 de *saccharomyces cerevisiae* [Tesis de Doctorado]. Universidad de Oviedo, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. <http://hdl.handle.net/10651/16236>
76. Rienzo, A. (2015) Estudio de la regulación dinámica de la expresión génica en respuesta a estrés osmótico en levadura [Tesis Doctoral]. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Biotecnología. <http://hdl.handle.net/10251/62160>
77. Rojas, M. D., Salcedo, L. A. G., García, A. G., & De los Ángeles López Cabrera, R. M. (s. f.). ::: *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)* ::: https://repositorio-uapa.cuaied.unam.mx/repositorio/moodle/pluginfile.php/2162/mod_resource/content/8/contenido/index.html

78. Rojas-Pirela, M., Andrade-Alviárez, D., Rojas, V., Kemmerling, U., Cáceres, A. J., Michels, P. A., Concepción, J. L., & Quiñones, W. (2020). Phosphoglycerate kinase: structural aspects and functions, with special emphasis on the enzyme from kinetoplastea. *Open Biology*, 10(11). <https://doi.org/10.1098/rsob.200302>
79. Salazar Montes A, & Sandoval Rodríguez A, & Armendáriz Borunda J (2013). Regulación de la expresión génica. Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=102743132>
80. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
81. Sánchez, A.M. (2007) Transmisión de la información genética. Bioquímica Clínica. Comisión de genética molecular, 26 (5) 265-271.
82. Santos, S. (2008) Análisis cuantitativo y modelización del metabolismo de la levadura *Pichia pastoris* [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Ingeniería Química. ISBN: 978-84-691-9968-8. <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2008/tdx-0925109-135020/ssj1de1.pdf>
83. Schoenfelder, S. & Fraser, P. (2019) Long-range enhancer-promoter contacts in gene expression control. *Nature Reviews. Genetics*, 2, 437. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0128-0>
84. Schöler, A., & Schüller, H. (1994). A Carbon Source-Responsive Promoter Element Necessary for Activation of the Isocitrate Lyase Gene ICL1 Is Common to Genes of the Gluconeogenic Pathway in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology*, 14(6), 3613-3622. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.6.3613-3622.1994>
85. Seiboth, B., Hartl, L., Pail, M., & Kubicek, C. P. (2003). d -Xylose Metabolism in Hypocrea jecorina : Loss of the Xylitol Dehydrogenase Step Can Be Partially Compensated for by lad1 -Encoded 1 -Arabinitol-4-Dehydrogenase. *Eukaryotic Cell*, 2(5), 867-875. <https://doi.org/10.1128/ec.2.5.867-875.2003>
86. Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1567-1572. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>

87. Silhavy TJ, Berman ML, Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusion, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
88. Smith, J. J., Brown, T. W., Eitzen, G. A., & Rachubinski, R. A. (2000). Regulation of Peroxisome Size and Number by Fatty Acid β -Oxidation in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal Of Biological Chemistry*, 275(26), 20168-20178. <https://doi.org/10.1074/jbc.m909285199>
89. Staff, B. B. (2019). What is an Oligo? *Behind the Bench*. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/what-is-an-oligo/>
90. Štagoj, M. N., Comino, A., & Komel, R. (2005). Fluorescence based assay of GAL system in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Microbiology Letters*, 244(1), 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.041>
91. Sullivan, R., & Zhao, H. (2007). Cloning, characterization, and mutational analysis of a highly active and stable l-arabinitol 4-dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 77(4), 845-852. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1225-0>
92. Taxonomy browser. (s. f.). NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=264483>
93. Thermo Fisher Scientific. (2021). PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase. Thermo Fisher Scientific. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012393_Phusion_HighFidelity_DNAPolymerase_UG.pdf
94. Torres, F. A. G., & Moraes, L. M. P. (2000). Proteínas recombinantes produzidas em levaduras. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 20-22.
95. Torres-Haro, A., Verdín, J., Kirchmayr, M. R., & Arellano-Plaza, M. (2021). Metabolic engineering for high yield synthesis of astaxanthin in *Xanthophyllomyces dendrophous*. *Microbial Cell Factories*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01664-6>
96. Torres, P.E. (2013) Predicción de promotores y elementos reguladores. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. <https://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/session11.pdf>

97. Umemura, K., Atomi, H., Kanai, T., Teranishi, Y., Ueda, M. & Tanaka, A. (1995) A novel promoter, derived from the isocitrate lyase gene of *Candida tropicalis*, inducible with acetate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 43, 489–492. <https://doi.org/10.1007/BF00218454>
98. Ursic, D., & Culbertson, M. R. (1991). The yeast homolog to mouse Tcp-1 affects microtubule-mediated processes. *Molecular And Cellular Biology*, 11(5), 2629-2640. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.5.2629>
99. Vázquez, M., Diniz, F & Martin, A.M. (1996). Single-Cell protein from Xanthophyllomyces dendrorhous yeast: continuous fermentation using peat extract as substrate. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria* 1:002, 12-16. DOI: 10.1080/11358129609487551
100. Yang, L., Yang, H., You, L., Ni, H., Jiang, Z., Du, X., Zhu, Y., Zheng, M., Li, L., Lin, R., Li, Z., & Li, Q. (2023). Transcriptomics analysis and fed-batch regulation of high astaxanthin-producing *Phaffia rhodozyma*/Xanthophyllomyces dendrorhous obtained through adaptive laboratory evolution. *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 50(1). <https://doi.org/10.1093/jimb/kuad015>
101. Yocom, R. R., Hanley, S., West, R., & Ptashne, M. (1984). Use of lacZ Fusions to Delimit Regulatory Elements of the Inducible Divergent GAL1-GAL10 Promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology*, 4(10), 1985-1998. <https://doi.org/10.1128/mcb.4.10.1985-1998.1984>
102. Wong, M. (2024). *What is dNTP? What Does dNTP Do in PCR?* DNA Testing Experts. <https://www.dnatestingexperts.com/es/what-is-dntp-what-does-dntp-do-in-pcr/>
103. Wöstemeyer, J., Grünler, A., Schimek, C., & Voigt, K. (2005). Genetic regulation of carotenoid biosynthesis in fungi. En Elsevier eBooks (pp. 257-274). [https://doi.org/10.1016/s1874-5334\(05\)80013-9](https://doi.org/10.1016/s1874-5334(05)80013-9)
104. Xiberras, J., Klein, M., & Nevoigt, E. (2019). Glycerol as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* based bioprocesses – Knowledge gaps regarding the central carbon catabolism of this ‘non-fermentable’ carbon source. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107378. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.017>

105. Yamamoto, K., Hara, K. Y., Morita, T., Nishimura, A., Sasaki, D., Ishii, J., Ogino, C., Kizaki, N., & Kondo, A. (2016). Enhancement of astaxanthin production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by efficient method for the complete deletion of genes. *Microbial Cell Factories*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0556-x>
106. Zhang, A., Luo, J., Zhang, T., Pan, Y., Tan, Y., Fu, C., & Tu, F. (2008). Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Reports*, 36(6), 1611-1619. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9359-4>
107. Zhou, D., Yang, L., Guo, F., Jiang, W., Jiang, Y., Zhang, W., Xin, F., & Jiang, M. (2024). High astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* strain DW6 from cane molasses using two-stage pH strategies. *Green Chemistry*, 26(8), 4582-4592. <https://doi.org/10.1039/d3gc04918c>