



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Mejoramiento del metabolismo de la xilosa en *Clavispora lusitaniae* a través
de evolución adaptativa para obtención de bioproductos**

Que presenta

M en C. Erika Alfayuset Ochoa Chacón

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de Tesis: **Dra. María Teresa Ponce Noyola**

Ciudad de México

Abril, 2023

COMITÉ TUTORIAL

Directora de Tesis:

Dra. María Teresa Ponce Noyola
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería- CINVESTAV

Asesores:

Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería – CINVESTAV

Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería – CINVESTAV

Dra. María de Lourdes Villa Tanaca
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas - IPN

Dr. Alfredo Martínez Jiménez
Instituto de Biotecnología – UNAM

CRÉDITOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Microbiana y Fermentaciones del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) Unidad Zacatenco.

El desarrollo de esta tesis de Doctorado tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del CVU 784763.

La estudiante Erika Alfayuset Ochoa Chacón recibió apoyo de grado por parte del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) Unidad Zacatenco.

AGRADECIMIENTOS

A mi mentora, la Dra. Teresa Ponce Noyola, quien ha sido a lo largo de 6 años una fuente de sabiduría, de ejemplo de excelente profesional y persona. Gracias por siempre aceptar las ideas para este proyecto y motivarnos a salir de nuestra zona de confort. Gracias por ser una representación femenina en la Academia que motiva a mantenerse en ella.

A la Coordinación Académica y Jefatura del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, al personal de apoyo del Departamento y al personal de la planta piloto, y a todos los que de una u otra forma hicieron posible la realización de este proyecto.

A mis asesores, los Dres y Dras. Ramos-Valdivia, Villa-Tanaka, Poggi-Varaldo y Martínez por su asesoría, por aceptar a ser parte de este proyecto y estar involucrados en cada uno de los avances del mismo. Gracias por ser unos excelentes profesionales y excelentes personas, gracias por apoyarme en este camino.

A la M. C. Odilia Pérez Ávalos, por la instrucción en técnicas de HPLC, detección de proteínas y medición de actividades enzimáticas. Su guía y apoyo siempre fue importante en el desarrollo de este proyecto.

A la técnica Verónica Soto, por el apoyo durante el desarrollo de experimentos de este proyecto. Su invaluable ayuda en las jornadas laborales permitió que el tiempo no fuera un factor limitante. Gracias por las charlas y las carcajadas Vero, gracias por hacer más amenas las tardes en el lab 17.

Al Dr. Ocadiz-Delgado, por su apoyo en el préstamo de equipos y en la asesoría durante mediciones de niveles de expresión por qPCR.

A mi amigo Alejandro Lara, por la compañía durante más de 4 años, por las largas discusiones de los experimentos, por las ocurrencias y las risas que nunca nos faltaron. Gracias por hacerlo todo más llevadero.

A Ricardo Castillo, por el trabajo técnico y experimental en el que estuvo involucrado durante el primer año de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, David y Josué, gracias por el apoyo y las conversaciones durante el desarrollo de este proyecto.

A mis mejores amigos Sergio y Solangy, gracias por siempre estar presentes, gracias por sus invaluable palabras de apoyo y amor durante los momentos más difíciles. Espero seguirlos teniendo en mi vida, los quiero mucho, amigos.

A mi compañero de camino, Jonathan, gracias por estar al pie del cañón durante cada una de las etapas de este proyecto. Tu apoyo, amor y compañía durante este proceso han sido invaluable. Gracias por ser mi muro de contención.

A las personas que de una u otra forma siempre apoyaron este proyecto, muchas gracias.

*A mi familia,
por su inmenso apoyo y amor durante
estos 4 años.*

*A las fuerzas universo,
por haberme traído a México a cumplir
mis sueños.*

*A mí misma,
por ser lo suficientemente valiente para
no desistir.*

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUCCIÓN	20
1.1. Biomasa lignocelulósica	20
1.1.1. Celulosa	21
1.1.2. Hemicelulosa	21
1.2. Degradación enzimática de la celulosa y hemicelulosa	22
1.2.1. Celulasas	22
1.2.2. Hemicelulasas	24
1.3. Catabolismo de la xilosa.....	25
1.3.1. Ruta de oxido-reducción (XR y XDH)	26
1.3.2. Ruta de isomerización (XI).....	28
1.4. Etanol	29
1.5. Xilitol.....	30
1.6. Mejoramiento del metabolismo de la xilosa en levaduras	32
1.6.1. Integración heteróloga de genes asociados con el metabolismo de la xilosa	32
1.6.2. Evolución adaptativa.....	34
1.7. <i>Clavispora lusitaniae</i> CDBB-L-2031	35
2. JUSTIFICACIÓN	37
3. HIPÓTESIS	38
3.1. Hipótesis alternativa 1	38
3.2. Hipótesis alternativa 2	38

4. OBJETIVOS	39
4.1. General.....	39
4.2. Específicos	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1. Microorganismos empleados y condiciones de cultivo	40
5.2. Medios de cultivo.....	40
5.2.1. Medio YP	40
5.2.2. Medio YM.....	40
5.2.3. Medio mínimo Breus	41
5.2.4. Medio LB.....	41
5.2.5. Medio YNB.....	41
5.3. Preparación del inóculo	41
5.4. Obtención de extracto crudo libre de células.....	41
5.5. Cuantificación de proteína.....	42
5.6. Determinación de actividad enzimática de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa.....	42
5.6.1. Determinación de actividad XR.....	42
5.6.2. Determinación de actividad de XDH	42
5.7. Cuantificación de sustratos y metabolitos	43
5.8. Extracción de DNA genómico de levaduras	43
5.9. Extracción de RNA total de levaduras.....	44
5.10. Purificación de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	45
5.11. Obtención de células calcio competentes de <i>E. coli</i>	46
5.12. Transformación de células calcio competentes de <i>E. coli</i>	46
5.13. Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos.....	47

5.14. Electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes para RNA	47
5.15. Síntesis de cDNA	48
5.16. PCR en punto final	48
5.17. Diseño de cebadores	49
5.18. PCR en tiempo real	52
5.19. Evolución adaptativa	53
5.20. Sacarificación enzimática de bagacillo de caña	54
5.20.1. Pretratamiento del bagacillo de caña de azúcar (BGC)	55
5.20.2. Diseño central compuesto	55
5.20.3. Sacarificación de BGC para fermentaciones	56
5.20.4. Clarificado del sacarificado	56
5.21. Producción de etanol y xilitol	56
5.22. Tolerancia de <i>C. lusitaniae</i> a diferentes concentraciones de etanol y xilosa	57
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	58
6.1. Etapa 1: Obtención de cepas mejoradas de <i>Clavispora lusitaniae</i>	58
6.2. Etapa 2: Obtención de cepas evolucionadas de <i>Clavispora lusitaniae</i>	58
6.3. Etapa 3: Análisis de los niveles de expresión de genes asociados al metabolismo de la xilosa	58
6.4. Etapa 4: Producción de etanol y xilitol a partir de sacarificados.....	58
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
7.1. Elección del marcador de selección para <i>C. lusitaniae</i>	60
7.2. Pruebas de sensibilidad de <i>C. lusitaniae</i> a antifúngicos.....	61
7.3. Evaluación de la sensibilidad a nourseotricina de <i>C. lusitaniae</i>	66

7.4. Establecimiento de una técnica de detección de colonias productoras de etanol en placa.....	69
7.5. Construcción <i>in silico</i> del vector de expresión para <i>C. lusitaniae</i>	70
7.6. Diseño y estandarización de cebadores para CluXI.....	73
7.7. Construcción del vector de expresión para <i>C. lusitaniae</i>	76
7.8. Evolución adaptativa en <i>Clavispora lusitaniae</i> CDBB-L-2031	82
7.9. Cinéticas de crecimiento <i>C. lusitaniae</i> wt y cepas evolucionadas en condiciones aerobias	84
7.10. Medición de actividades enzimáticas de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa.....	91
7.11. Evaluación de Clu_Ev3 bajo diferentes condiciones de sustrato	97
7.11.1. Cinética de Clu_Ev3 en MMB suplementado con 1.5 y 2% de xilosa	97
7.11.2. Cinética de Clu_Ev3 en MMB suplementado con mezcla 1.5:1 y 1:1 de xilosa:glucosa	100
7.12. Estandarización de las condiciones de amplificación de los cebadores.....	103
7.13. Medición de los niveles de expresión de <i>XYL1</i> , <i>XYL2</i> , <i>XYL3</i> , <i>GXS1</i> , <i>HXT1</i> y <i>XYLT</i> en cinéticas de crecimiento de <i>C. lusitaniae</i> wt y cepas evolucionadas en condiciones aerobias.....	105
7.14. Establecimiento del diseño experimental para las mejores condiciones de sacarificación de BGC (Diseño central compuesto)	114
7.15. Cinéticas de producción con sacarificados de bagacillo de caña.....	119
7.16 Tolerancia de <i>C. lusitaniae</i> wt y Clu_Ev3 a diferentes concentraciones de xilosa y etanol.....	123
CONCLUSIONES.....	126
BIBLIOGRAFÍA	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la biomasa lignocelulósica.....	21
Figura 2. Estructura química de la celulosa y hemicelulosa	22
Figura 3. Mecanismo de degradación de la celulosa.....	24
Figura 4. Enzimas degradadoras de la hemicelulosa y su especificidad de acción	25
Figura 5. Rutas de asimilación de la xilosa.....	27
Figura 6. Variación anual, tendencia y producción global de bioetanol en miles de m ³	30
Figura 7. Estrategias de producción del xilitol y sus aplicaciones.	32
Figura 8. (A) <i>Clavispora lusitaniae</i> observada al microscopio y (B) crecimiento en placa de agar YPD.	36
Figura 9. Ciclaje de la reacción de PCR punto final.	49
Figura 10. Proceso de evolución de <i>C. lusitaniae</i> CDBB-L-2031 en condiciones aerobias y en condiciones limitadas de oxígeno en MMB suplementado con xilosa y glucosa a 30 °C y 150 rpm	54
Figura 11. Crecimiento de <i>C. lusitaniae</i> durante 6 h en medio SD con levadura libre de aminoácidos suplementado con drop-out de uracilo y leucina	60
Figura 12. Crecimiento después de 24 h en placa con medio PDA de las levaduras <i>C. glabrata</i> CBS 138, <i>C. krusei</i> ATCC 14423, <i>C. glabrata</i> CGL 43, <i>C. lusitaniae</i> CDBB-L-2031.	62
Figura 13. Esquema general de las concentraciones finales de los antifúngicos en la placa de 96 pozos y la distribución de las cepas usadas.	63
Figura 14. Crecimiento de las levaduras evaluadas en diferentes concentraciones de Anfotericina B, Caspofungina y Fluconazol a las 24 h de cultivo.	64
Figura 15. Ensayo de sensibilidad de <i>C. lusitaniae</i> a diferentes concentraciones de nourseotricina en medio YNB-X, 30 °C, 200 rpm..	68
Figura 16. Análisis de sensibilidad de <i>C. lusitaniae</i> a diferentes concentraciones de nourseotricina.....	68

Figura 17. Formación de halos de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> alrededor de colonias productoras de etanol de <i>C. lusitaniae</i> en medio YNB-C.	70
Figura 18. Mapa del vector de expresión de la xilosa isomerasa en <i>Clavispora lusitaniae</i>	71
Figura 19. Electroforesis de la purificación y evaluación de los vectores pV1093 y pUC-XylA por medio de digestión enzimática.	73
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la amplificación por PCR de los fragmentos que componen el plásmido CluXI	75
Figura 21. Estrategia de corte y ligación para la construcción el vector pCluXI. ..	76
Figura 22. Estrategia de ensamblado por ligación y restricción de los fragmentos que conforman el plásmido CluXI.....	77
Figura 23. Ligaciones en pares de los 8 fragmentos que constituyen el vector pCluXI..	78
Figura 24. Esquema general de la estrategia 2 de clonación y replicación para la construcción del vector pCluXI	79
Figura 25. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos purificados pDrive y pBluescript II KS clonados en <i>E. coli</i> DH5 α (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones enzimáticas de los plásmidos ligados	80
Figura 26. Consumo de sustrato por Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3 a diferentes puntos del proceso de evolución en condiciones aerobias en medio mínimo Breus suplementado con 2% de xilosa y concentraciones crecientes de xilosa a 30 °C y 150 rpm.	83
Figura 27. Consumo de sustrato y crecimiento de <i>C. lusitaniae</i> wt, Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3 en MMB suplementado con xilosa:glucosa en relación 2:1 en condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm.....	85
Figura 28. Consumo de sustrato y acumulación de productos por <i>C. lusitaniae</i> wt, Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3 en MMBXG con una relación 2:1 en condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm.....	88
Figura 29. Actividad específica de la xilosa reductasa usando NADPH y NADH como cofactor, y de la xilitol deshidrogenasa en <i>C. lusitaniae</i> wt y en las cepas evolucionadas	95

Figura 30. Consumo de sustrato, crecimiento y producción de xilitol por Clu_Ev3 en MMB con 1.5% y 2% de xilosa en condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm.....	99
Figura 31. Consumo de sustrato y crecimiento y acumulación de productos por Clu_Ev3 en MMB 1.5% de xilosa y 1% de glucosa en condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm.	101
Figura 32. Consumo de sustrato y crecimiento y acumulación de productos por Clu_Ev3 en MMB 1% de xilosa y 1% de glucosa en condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm.	102
Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la PCR en gradiente de temperatura para los genes <i>GXS1</i> , <i>HXT1</i> , <i>XYLT</i> , <i>XKS1</i> y <i>ADH1</i> ...	104
Figura 34. Integridad del RNA total tratado con DNasa I tras su extracción.	106
Figura 35. Síntesis de cDNA por medio de PCR punto final usando los cebadores del gen <i>ACT1</i> y <i>GAPDH</i>	106
Figura 36. Diseño de los experimentos de qPCR para medición de expresión de <i>XYL1</i> , <i>XYL2</i> , <i>XKS1</i> , <i>HXT1</i> y <i>GXS1</i> de <i>C. lusitaniae</i> wt y Ev3.	108
Figura 37. Niveles de expresión de los genes <i>XYL1</i> , <i>XYL2</i> y <i>XKS1</i> en Clu_Ev3 respecto a la cepa control crecidas en MMB suplementado con 2% xilosa y 1% glucosa.	110
Figura 38. Regulación de la expresión de los genes <i>XYL1</i> , <i>XYL2</i> , <i>XKS1</i> , <i>HXT1</i> , <i>GXS1</i> y <i>PDC1</i> en Clu_Ev3 respecto a <i>C. lusitaniae</i> wt en medio MMB suplementado con 2% de xilosa y 1% de glucosa en condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm.	111
Figura 39. Niveles de expresión de los genes <i>HXT1</i> y <i>GXS1</i> en <i>C. lusitaniae</i> Ev3 respecto a la cepa control crecidas en MMB suplementado con 2% xilosa y 1% glucosa.	112
Figura 40. Nivel de expresión del gen <i>PDC1</i> en <i>C. lusitaniae</i> Ev3 respecto a la cepa control crecidas en MMB suplementado con 2% xilosa y 1% glucosa.	113
Figura 41. Azúcares reductores cuantificados por el método de DNS en cada experimento de sacarificación de BGC después de 12 h de incubación a las temperaturas correspondientes de cada corrida con una agitación de 150 rpm.	116
Figura 42. Gráfica de contorno dónde se muestran las concentraciones de azúcares obtenidas en cada una de las corridas del diseño central compuesto.	116

Figura 43. Análisis de optimización de la sacarificación de BGC en el software Desing expert.	117
Figura 44. Perfil de azúcares en los experimentos de sacarificación de BGC del diseño central compuesto e intervalos de la concentración de los principales azúcares en los experimentos de sacarificación.	118
Figura 45. Crecimiento y consumo de sustrato por <i>C. lusitaniae</i> wt, Clu_Ev3, <i>S. stipitis</i> y <i>S. cerevisiae</i> en condiciones microaerobias a 30 °C y 150 rpm.	119
Figura 46. Consumo de glucosa y xilosa y producción de xilitol y etanol por <i>C. lusitaniae</i> wt, Clu_Ev3, <i>S. stipitis</i> y <i>S. cerevisiae</i> en condiciones microaerobias a 30 °C y 150 rpm.	121
Figura 47. Crecimiento de <i>C. lusitaniae</i> wt, Clu_Ev3 y <i>S. cerevisiae</i> en medio YPD tras incubar 1 h en etanol (%): (a) 0, (b) 5, (c) 10 durante 18 h a 30 °C.....	123
Figura 48. Crecimiento de <i>C. lusitaniae</i> wt, Clu_Ev3 y <i>S. stipitis</i> en medio YNB suplementado con xilosa durante 48 h a 30 °C.....	125

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades específicas de XR y XDH en levaduras.	28
Tabla 2. Actividades de la xilosa isomerasa expresada heterológamente en <i>S. cerevisiae</i>	33
Tabla 3. Secuencias y características de los cebadores diseñados por Santiago Benítez, 2017.	50
Tabla 4. Secuencias y características de los cebadores diseñados en este trabajo.	51
Tabla 5. Diseño central compuesto para ensayo de sacarificación de BGC.	55
Tabla 6. Concentraciones de nourseotricina reportadas para la selección de levaduras recombinantes.	66
Tabla 7. Colonias de <i>C. lusitaniae</i> presentes en medio YNB-X adicionado con diferentes concentraciones de nourseotricina (NTC).	67
Tabla 8. Genes usados para la construcción del vector de expresión.	70
Tabla 9. Secuencias de los cebadores diseñados para el ensamblaje de CluXI. .	74
Tabla 10. Diseño de las construcciones parciales para replicación de los fragmentos duales del vector pCluXI.	80
Tabla 11. Cambios en la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y velocidad de consumo de sustrato de las cepas evolucionadas de <i>C. lusitaniae</i> durante el proceso de evolución.	84
Tabla 12. Velocidades específicas de consumo de sustrato (q_s^a) de <i>C. lusitaniae</i> wt y cepas evolucionadas.	86
Tabla 13. Parámetros cinéticos de <i>C. lusitaniae</i> wt, Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3 durante la fermentación en medio MMB-XG 2:1 en condiciones aerobias.	89
Tabla 14. Comparación de las velocidades de consumo de xilosa y rendimiento de xilitol de levaduras tras procesos de evolución adaptativa.	91
Tabla 15. Levaduras y actividades enzimáticas de XR y XDH en diferentes condiciones de aireación.	94

Tabla 16. Parámetros cinéticos de la cepa Clu_Ev3 en diferentes sustratos en condiciones aerobias.....	99
Tabla 17. Evaluación de <i>ACT1</i> y <i>ADH1</i> como candidatos a controles endógenos para los análisis de niveles de expresión.	108
Tabla 18. Azúcares liberados y rendimientos de los experimentos del diseño central compuesto para definir las mejores condiciones de sacarificación del bagacillo de caña.	115
Tabla 19. Parámetros cinéticos de las fermentaciones usando SBC como sustrato.	122
Tabla 20. Supervivencia de <i>C. lusitaniae</i> wt, Clu_Ev3 y <i>S. cerevisiae</i> 2-24D tras ser incubadas 1 h en diferentes concentraciones de EtOH.....	124

ABREVIATURAS

BGC: bagacillo de caña

CE: control de esterilidad

CLO: condiciones limitadas de oxígeno

CLSI: por sus siglas en inglés, *Clinical and Laboratory Standards Institute*

FPU: por sus siglas en inglés, *Filter paper unit*

MMB-XG: medio mínimo Breus suplementado con xilosa y glucosa

MOPS: por sus siglas en inglés, *3-(N-morpholino) propanesulfonic acid*

NTC: por sus siglas en inglés, no template control

XDH: xilitol deshidrogenasa

XI: xilosa isomerasa

XilOH: xilitol

XR: xilosa reductasa

RESUMEN

En el presente trabajo, se obtuvieron cepas evolucionadas a partir de la cepa silvestre (wt) *Clavispora lusitaniae* CDBB-L-2031, con el objetivo de buscar nuevas cepas capaces de asimilar de manera integral los azúcares presentes en los sacarificados de biomasa lignocelulósica. El proceso de evolución adaptativa se llevó a cabo en medio mínimo Breus suplementado con xilosa y glucosa. Se seleccionaron las cepas evolucionadas Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3 por presentar un aumento significativo en las velocidades de consumo específicas de xilosa, productividad y rendimiento de xilitol en comparación con la cepa wt. Este aumento en el metabolismo de la xilosa estuvo acompañado con un aumento significativo en las actividades de la xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa. La cepa Clu_Ev3 presentó las mejores características y se seleccionó como la mejor cepa evolucionada. Los análisis de expresión génica comparando Clu_Ev3 respecto a wt, mostraron que el aumento de las actividades enzimáticas de XR y XDH estuvo acompañado con un aumento en la expresión relativa de los genes *XYL1*, *XYL2* y *XYL3*. Así mismo se demostró que los genes *HXS1*, *GXS1* y *XYLT* están asociados al transporte de la xilosa, debido a que estuvieron regulados positivamente en presencia de dicha pentosa. Finalmente, durante la producción de etanol y xilitol, Clu_Ev3 mostró velocidades específicas de consumo de xilosa y productividad de xilitol superiores a la cepa wt. Por lo anterior, se propone el uso de la cepa evolucionada Clu_Ev3 como plataforma para la producción de estos compuestos usando sacarificados de bagacillo de caña.

ABSTRACT

In the search for new strains capable of integrally assimilating the sugars present in the saccharified lignocellulosic biomass, it was obtained evolved strains of *Clavispora lusitaniae* CDBB-L-2031. The adaptive evolution process was carried out in Breus minimal medium supplemented with xylose and glucose. Following this process, strains Clu_Ev1, Clu_Ev2 and Clu_Ev3 were selected for showing a significant increase in xylose-specific consumption rates, productivity and xylitol yield compared to the wild-type strain (wt). A significant increase in xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities accompanied this increase in xylose metabolism. Strain Clu_Ev3 showed the best characteristics and was selected as the best evolved strain. Gene expression analysis comparing Clu_Ev3 to wt showed that an increase in the relative expression of *XYL1*, *XYL2* and *XYL3* genes accompanied the increase in the enzymatic activities of XR and XDH. It was also demonstrated that the *HXS1*, *GXS1* and *XYLT* genes are associated with xylose transport because they were positively regulated in the presence of this pentose. Finally, during ethanol and xylitol production, Clu_Ev3 showed higher specific xylose consumption rates and xylitol productivity than strain wt, thus demonstrating its potential to be used as a platform to produce these compounds using saccharified sugarcane bagasse.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica está compuesta de celulosa, hemicelulosa, lignina, extractos y diferentes materiales inorgánicos (Saini et al., 2015; Singla et al., 2012) (**Figura 1**). La glucosa y la xilosa son los componentes mayoritarios de la fracción de polisacáridos de este tipo de biomasa. El aprovechamiento eficiente de estos compuestos es un punto importante para la obtención de productos de valor agregado a larga escala.

A pesar del gran potencial que representan los residuos lignocelulósicos, su aprovechamiento encara 3 grandes retos (Moysés et al., 2016):

1. Una etapa de pretratamiento que involucra el uso de agentes fisicoquímicos y de enzimas hidrolíticas, es necesaria para liberar los azúcares fermentables.
2. Algunos compuestos derivados de las etapas de pretratamiento (furaldehídos, acetato, formato, derivados fenólicos) son conocidos inhibidores de la fermentación.
3. Las pentosas no son fermentables por *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura comúnmente usada en los procesos de producción.

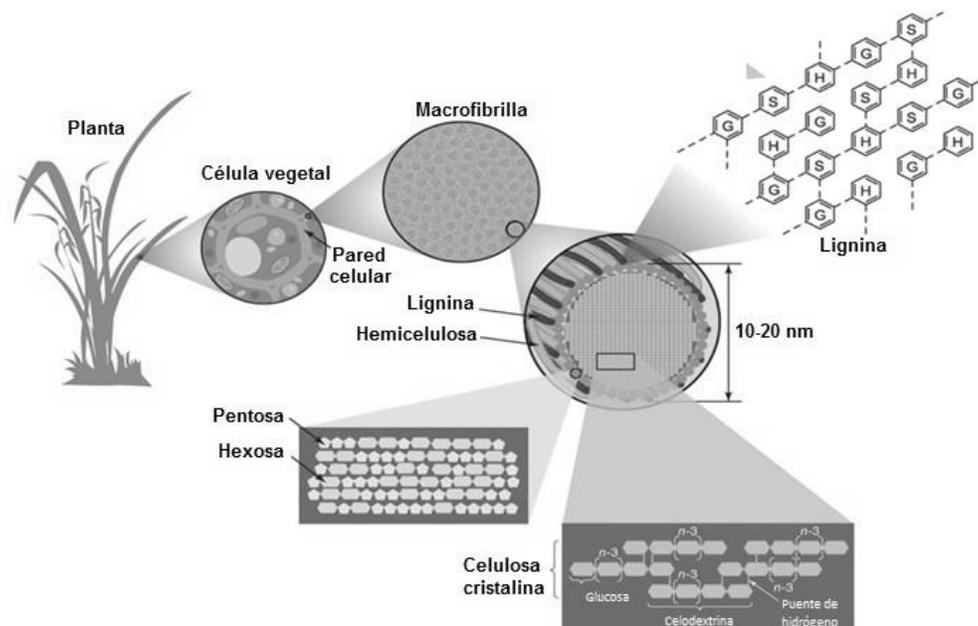


Figura 1. Estructura de la biomasa lignocelulósica. (Modificado de Rubin, 2008).

1.1.1. Celulosa

La celulosa es el componente estructural mayoritario en la pared celular de las plantas. Es un homopolímero lineal, conformado por unidades de glucosa (500 – 15,000) que están unidas por enlace glicosídico β -1,4, siendo la celobiosa la unidad repetitiva más pequeña. Dada la presencia del enlace β -1,4 existe una alta posibilidad de la formación de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares los cuales hacen que la celulosa se presente con una estructura altamente organizada, cristalina, insoluble y resistente a la actividad enzimática (Chesson & Forsberg, 1997). Se estima que alrededor de 180 mil millones de toneladas de celulosa son producidas por las plantas anualmente, por lo que constituye una de las fuentes de carbono renovables más importantes que hay sobre la Tierra (Antony & thottiam Vasudevan, 2018) (**Figura 2**).

1.1.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero corto y altamente ramificado de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, galactosa, glucosa) (50 - 200 unidades), y algunos residuos ácidos como el acético, galacturónico y glucurónico (Álvarez et al., 2016)

(Figura 2). El papel de la hemicelulosa es proveer una unión entre la celulosa y la lignina. Después de la celulosa, la hemicelulosa es el segundo polímero más abundante en la biomasa lignocelulósica, representando del 20 – 35 %.

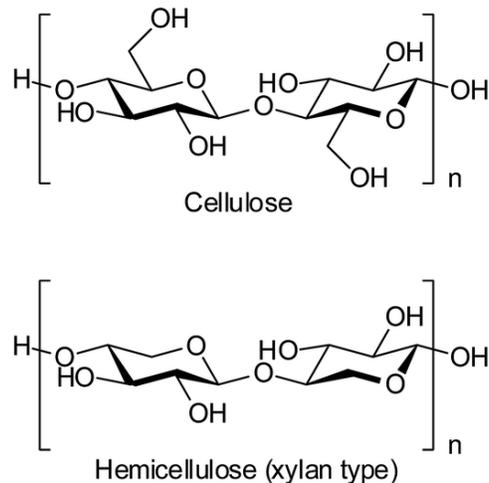


Figura 2. Estructura química de la celulosa y hemicelulosa (Kobayashi et al., 2016).

1.2. Degradación enzimática de la celulosa y hemicelulosa

Cuando se trata de la degradación biológica de la celulosa y hemicelulosa se habla de complejos enzimáticos que realizan la degradación de estos componentes. Para el caso de la celulosa, las enzimas se denominan celulasas y, para la hemicelulosa se denominan hemicelulasas o xilanasas.

1.2.1. Celulasas

Las celulasas están implicadas en la degradación de la celulosa a celodextrinas, celobiosa y glucosa, actuando de manera sinérgica. Para su estudio han sido clasificadas de acuerdo con su acción catalítica. Sin embargo, en la actualidad también se clasifican tomando en cuenta sus propiedades estructurales (Henrissat & Davies, 1997).

Se han encontrado tres tipos principales de actividades enzimáticas:

- EC 3.2.1.4. Endocelulasas que rompen aleatoriamente enlaces internos en las regiones amorfas de la celulosa.
- EC 3.2.1.91 Exocelulasas o celobiohidrolasas que escinden de dos a cuatro unidades de los extremos de las cadenas expuestas producidas por la endocelulasa, dando como resultado tetrasacáridos o disacáridos, como la celobiosa.
- EC 3.2.1.21 Celobiasas o β -glucosidasas, que hidrolizan el producto de las exocelulasas a monosacáridos.

Las endoglucanasas cortan al azar el enlace β -1,4 de las regiones internas en sitios amorfos de la cadena de celulosa, generando oligosacáridos de distintas longitudes y a su vez nuevos extremos libres. Las exoglucanasas actúan de forma progresiva en los extremos reductores y no reductores de la celulosa liberando glucosa o celobiosa como productos mayoritarios. La β -glucosidasa hidroliza la celobiosa, la cual es un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa unidas por el enlace β -1,4 (Kumar et al., 2008; Singhania et al., 2013). La hidrólisis total de la celulosa cristalina requiere de la acción de las endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas; sin embargo, a partir de celulosa amorfa sólo se requiere de la acción combinada de la actividad de las endoglucanasas y de la β -glucosidasa, para liberar glucosa y celobiosa principalmente (**Figura 3**) (Zhang & Lynd, 2004).

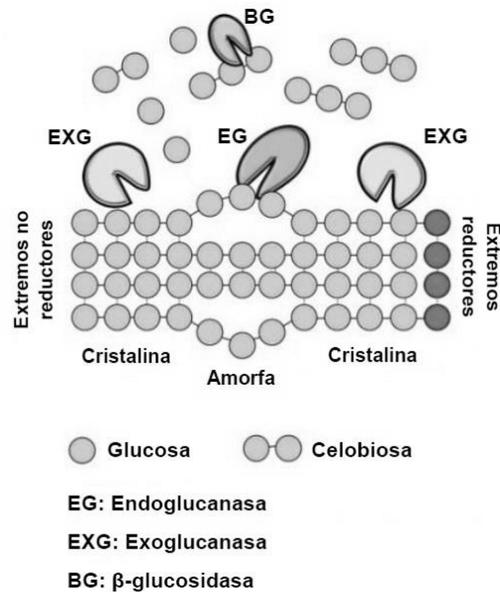


Figura 3. Mecanismo de degradación de la celulosa (Modificado de Lynd et al., 2002).

1.2.2. Hemicelulasas

Dentro de las enzimas para la degradación de la fracción de hemicelulosa se encuentran las xilanasas, que hidrolizan los sacáridos de xilosa y el xilano, debido a que es la pentosa más abundante en esta fracción.

La degradación efectiva de la fracción de hemicelulosa en la biomasa lignocelulósica es un tema de interés comercial, no sólo para el área de los biocombustibles sino para la industria del papel y compuestos químicos. La mayoría de las enzimas hemicelulolíticas pertenecen a la familia de las glucohidrolasas (GH), basado en la secuencia de aminoácidos y en las similitudes estructurales concomitantes a la base de datos de enzimas (CAZy) (Henrissat & Davies, 1997; Lombard et al., 2014).

Las xilanasas se clasifican en dos grupos:

- Endo-1,4- β D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8): hidrolizan aleatoriamente la cadena de xilano

- β -D-xilosidasas (E.C. 3.2.1.37): hidroliza los sacáridos de xilano a monómeros de xilosa.

En conjunto con las xilanasas, las arabinasas se utilizan en menor medida para la degradación de la hemicelulosa. Dentro de las arabinasas se encuentran las α -L-arabinoduranosidasas (E.C. 3.2.1.55) que catalizan la eliminación de los grupos laterales de los xilanosacáridos. Por otro lado, las α -D glucoronidasas (E.C. 3.2.1.139) y las acetil xilano esterases (3.1.1.72) remueven las ramificaciones de grupos acetilo y fenólicos (Prajapati et al., 2018; Yegin, 2022) (**Figura 4**).

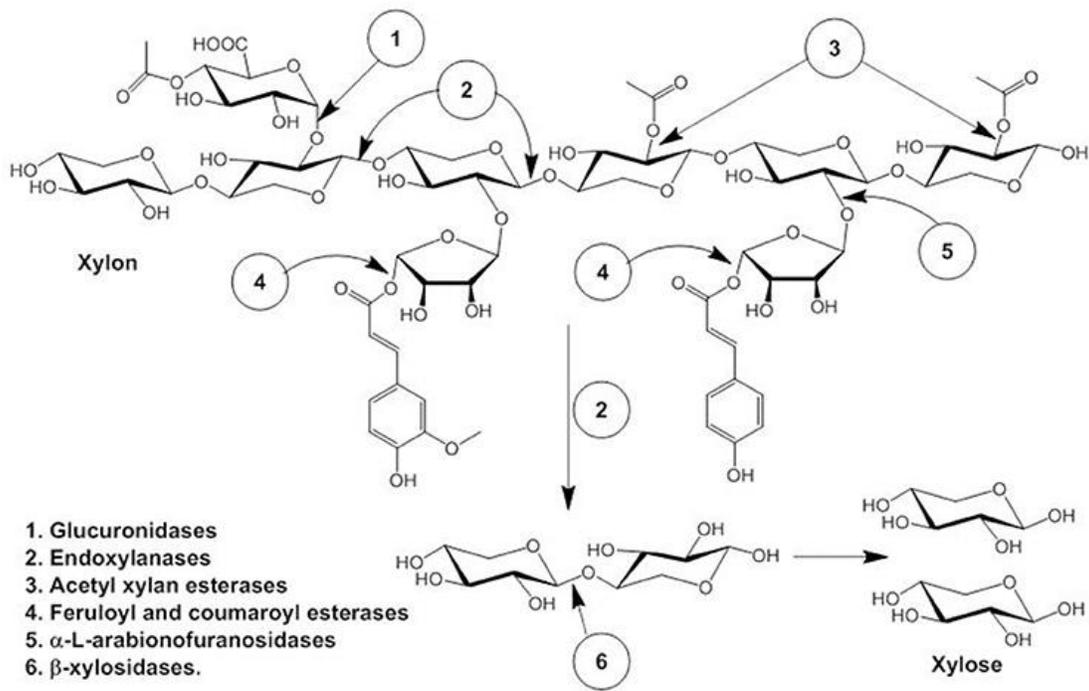


Figura 4. Enzimas degradadoras de la hemicelulosa y su especificidad de acción (Yadav et al., 2018).

1.3. Catabolismo de la xilosa

Uno de los problemas asociados al aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos es la fermentación de la xilosa presente en los hidrolizados de este material. *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismo modelo de las fermentaciones, no posee una ruta de asimilación para la xilosa, sólo posee una

aldosa reductasa inespecífica que cataliza la conversión de la xilosa a xilitol (Kim et al., 2013; Träff-Bjerre et al., 2004).

La asimilación de pentosas es llevada a cabo principalmente por levaduras del tipo no-*Saccharomyces*, tales como *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae* y *Clavispora lusitaniae*. Sin embargo, éstas no han sido consideradas para los procesos de producción de bioproductos a gran escala. La mayoría de los estudios que involucran la fermentación de pentosas en levaduras están enfocados en modificar genéticamente a *S. cerevisiae* con la expresión de forma heteróloga de rutas metabólicas de xilosa (Chapla et al., 2015; Dasgupta et al., 2017; Ochoa-Chacón et al., 2022; Veras et al., 2017).

La xilosa es metabolizada a través de dos rutas: una de oxido-reducción y otra de isomerización. La primera encontrada principalmente en hongos y levaduras y, la segunda en bacterias y hongos del género *Piromyces* sp. (**Figura 5**).

1.3.1. Ruta de oxido-reducción (XR y XDH)

En la ruta de oxido-reducción, la actividad combinada de la xilosa reductasa (XR) y xilitol deshidrogenasa (XDH), convierte la xilosa a xilulosa. La mayoría de las levaduras presentan esta ruta, pero no todas ellas son capaces de llevar a cabo la fermentación de la xilosa a etanol. Esto se debe en mayor medida a la preferencia de los cofactores de cada una de las enzimas. XR suele preferir el NADPH en lugar del NADH, esto genera un desbalance en los cofactores debido a que XDH prefiere el cofactor NAD⁺ para llevar a cabo su actividad (Bruinenberg et al., 1983; Jin et al., 2004). En el caso particular de *Pichia pastoris*, que es una levadura que fermenta la xilosa, posee una XR que tiene afinidad por ambos cofactores NADPH y NADH, con esto se solventa el desbalance de cofactores, debido a que sí existe el recambio de éstos con XDH (Bruinenberg et al., 1984). En la **Tabla 1** se muestran las actividades enzimáticas de XR y XDH en algunas levaduras fermentadoras y no fermentadoras de xilosa.

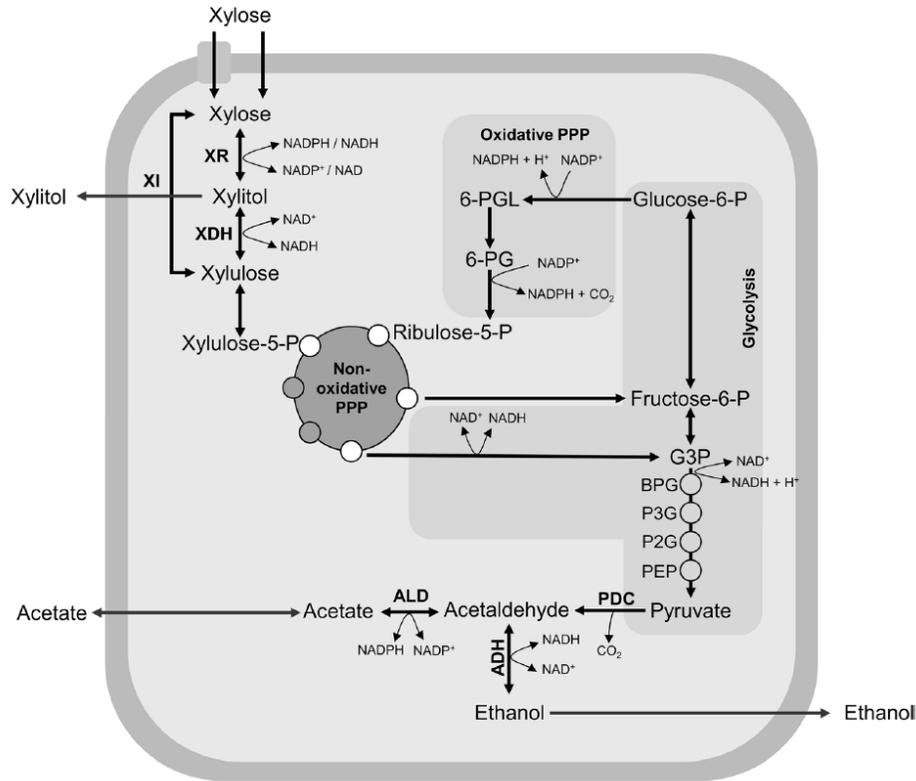


Figura 5. Rutas de asimilación de la xilosa (Ochoa-Chacón et al., 2022).

Para solventar los inconvenientes con la ruta oxidorreductora de asimilación de xilosa, se han realizado modificaciones mediante ingeniería de proteínas, para cambiar la preferencia de cofactores de la XR y XDH. Las cepas que han sido obtenidas mostraron una disminución de la acumulación de xilitol y un aumento del rendimiento de etanol (Lee et al., 2017; Abu Saleh, et al., 2007; Pack, et al., 2007; Watanabe et al., 2007). También la introducción de agentes reductores en el medio de cultivo ha mostrado ser lo bastante eficiente para solventar el desbalance de los cofactores debido a que permite la reducción de éstos y mantiene la retroalimentación entre XR y XDH, un ejemplo de ello es el ácido acético (Wei et al., 2013; Zhang et al., 2016).

Tabla 1. Actividades específicas de XR y XDH en levaduras.

Levadura	Actividad específica (U/mg)			
	Xilosa reductasa		Xilitol deshidrogenasa	
	NADPH	NADH	NAD ⁺	NADP ⁺
<i>Candida didensiae</i> F-3	0.63	0.03	0.40	<0.01
<i>Candida intermediae</i> TabII	4.74	0.16	3.62	0.21
<i>Candida parapsilopsis</i> 42	0.90	0.04	0.01	<0.01
<i>Candida silvanoru</i> VGI-II	5.10	0.26	4.11	0.21
<i>Candida tropicalis</i> Y-456	6.43	0.14	1.10	0.06
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-488	0.16	<0.01	0.04	<0.01
<i>Pichia guilliermondii</i> Y-1017	0.61	0.02	0.18	<0.01
<i>Torulopsis molishiana</i> 55	0.11	<0.01	0.01	<0.01
<i>Pachyloson tannophilus</i> Y-1532, Y-1533, Y-1634	2.00-2.10	1.39-1.56	4.04-5.26	0.01-0.12
<i>Candida shehatae</i> Y-1632*	3.40	4.93	13.53	0.42
<i>Pichia stipitis</i> Y-2160*	4.84	10.37	8.37	0.27
<i>Clavispora lusitaniae</i>	3.62	-	2.34	-

Tomado y modificado de Yablochkova et al. (2003).

*Levaduras productoras de etanol a partir de xilosa.

1.3.2. Ruta de isomerización (XI)

En la ruta de isomerización sólo actúa la xilosa isomerasa (XI) en la conversión de xilosa a xilulosa, sin requerimientos de cofactores. La reacción puede llevarse a cabo en condiciones aerobias y anaerobias, contrario a la ruta de óxido-reducción que requiere de la presencia de oxígeno. La ruta de la XI elimina el desbalance de cofactores y la excesiva producción de xilitol, es por ello que se buscó expresar XI de organismos procariontes pero a pesar de los esfuerzos, no han podido ser expresadas de forma eficiente en *S. cerevisiae* (Brat et al., 2009; Cunha et al., 2019; Peng et al., 2015). Sólo se obtuvieron aumentos considerables en el consumo de xilosa y producción de etanol, expresando funcionalmente en *S. cerevisiae* las XI de los hongos anaeróbicos *Piromyces* y *Orpinomyces* (Bae et al., 2021; Cunha et al., 2019; Li et al., 2016; Liu et al., 2018; Seike et al., 2019).

1.4. Etanol

El rápido agotamiento a nivel mundial de las reservas de combustibles fósiles y el calentamiento global han llevado a que se desencadene la búsqueda de nuevas alternativas renovables para la obtención de energía. Como solución a esta problemática han surgido los biocombustibles, dentro de los cuales se considera al bioetanol como la alternativa más usada en lugar de los combustibles fósiles convencionales. Lo anterior debido principalmente a su alto octanaje y su combustión eficiente (Moysés et al., 2016).

Actualmente existen diversas materias primas para la producción de etanol, tales como el almidón de maíz y el azúcar de caña (primera generación); cultivos de alta densidad (tercera generación) y fuentes de carbono alternativas como CO₂ usando OGM (organismos genéticamente modificados). El etanol de segunda generación es el producido a partir de biomasa lignocelulósica y es uno de los principales tipos de biocombustibles que está siendo producido comercialmente. Durante la última década (2011-2020), la producción global de bioetanol creció en 18%, alcanzando un máximo de 112 millones de metros cúbicos en 2019. Durante el año 2020 se observó una disminución en la producción de bioetanol debido a las restricciones de movilidad y a la caída de la actividad económica por la pandemia de COVID-19. Estados Unidos y Brasil son los mayores productores de bioetanol en el mundo, representando el 84% de la producción mundial (Torroba, 2021) (**Figura 6**).

En Estados Unidos y Brasil la producción de bioetanol se lleva a cabo a partir de almidón de maíz y azúcar de caña, respectivamente (Mussatto et al., 2010). Sin embargo, en países como México, el uso de dichas materias primas compromete la seguridad alimentaria y encarecería los alimentos (Guo & Tanaka, 2022). Una alternativa biotecnológica en la producción de etanol, que permite superar esos problemas es la utilización de residuos lignocelulósicos para su producción (Patel & Shah, 2021).

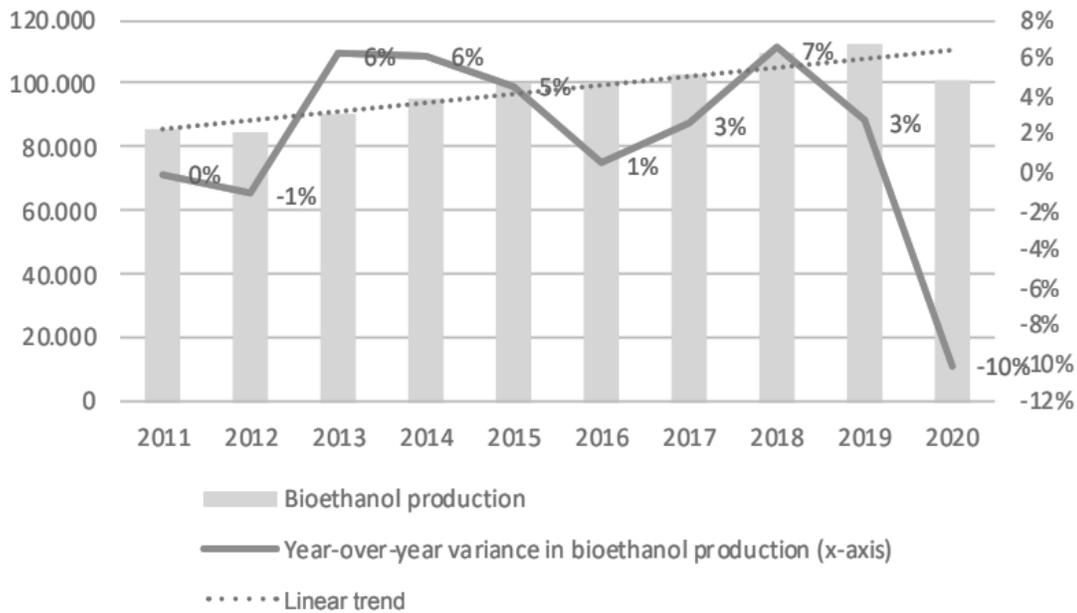


Figura 6. Variación anual, tendencia y producción global de bioetanol en miles de m³ (Torroba, 2021).

1.5. Xilitol

El xilitol es un polialcohol de 5 carbonos que es utilizado comercialmente como edulcorante en la industria alimentaria y farmacéutica. Además, este compuesto posee menor aporte calórico (2.4 cal/g) comparado con la sacarosa (4 cal/g) aunque posee casi la misma capacidad edulcorante que esta última (Tiefenbacher, 2017; Umai et al., 2022).

Actualmente a nivel mundial, la mayoría del xilitol producido se obtiene a través de síntesis química. Este método consiste en extraer la xilosa presente en la biomasa lignocelulósica y usarla para producir xilitol a través de hidrogenación catalítica a altas presiones y temperaturas. En un esfuerzo por reducir los costos de producción, se han empezado a emplear microorganismos como *E. coli* y *S. cerevisiae* para la obtención de xilitol a través del aprovechamiento de residuos lignocelulósicos (Mathew et al., 2018).

La conversión biológica de la xilosa a xilitol es llevada a cabo por microorganismos que metabolizan dicha pentosa (Espinoza-Acosta, 2020). Como se mencionó previamente, ciertas levaduras tienen la capacidad de utilizar xilosa y convertirla en xilitol, además de etanol y por ello son los microorganismos más usados para su producción. Ciertas bacterias y hongos filamentosos también han sido usados para la producción de xilitol (Xu et al., 2019).

A pesar de que la materia prima para la producción de xilitol se encuentra disponible en todo el mundo, los costos de la síntesis química del xilitol han mantenido su producción relegada a ciertos países de Europa, Asia y a los Estados Unidos (Delgado Arcaño et al., 2020). Sin embargo, durante los últimos años ciertas empresas en China (Thomson Biotech) y Estados Unidos (ZuChem) han logrado implementar bioconversiones eficientes para la producción de xilitol (Ravella et al., 2012). En la **Figura 7** se muestran las estrategias de producción de xilitol y sus aplicaciones.

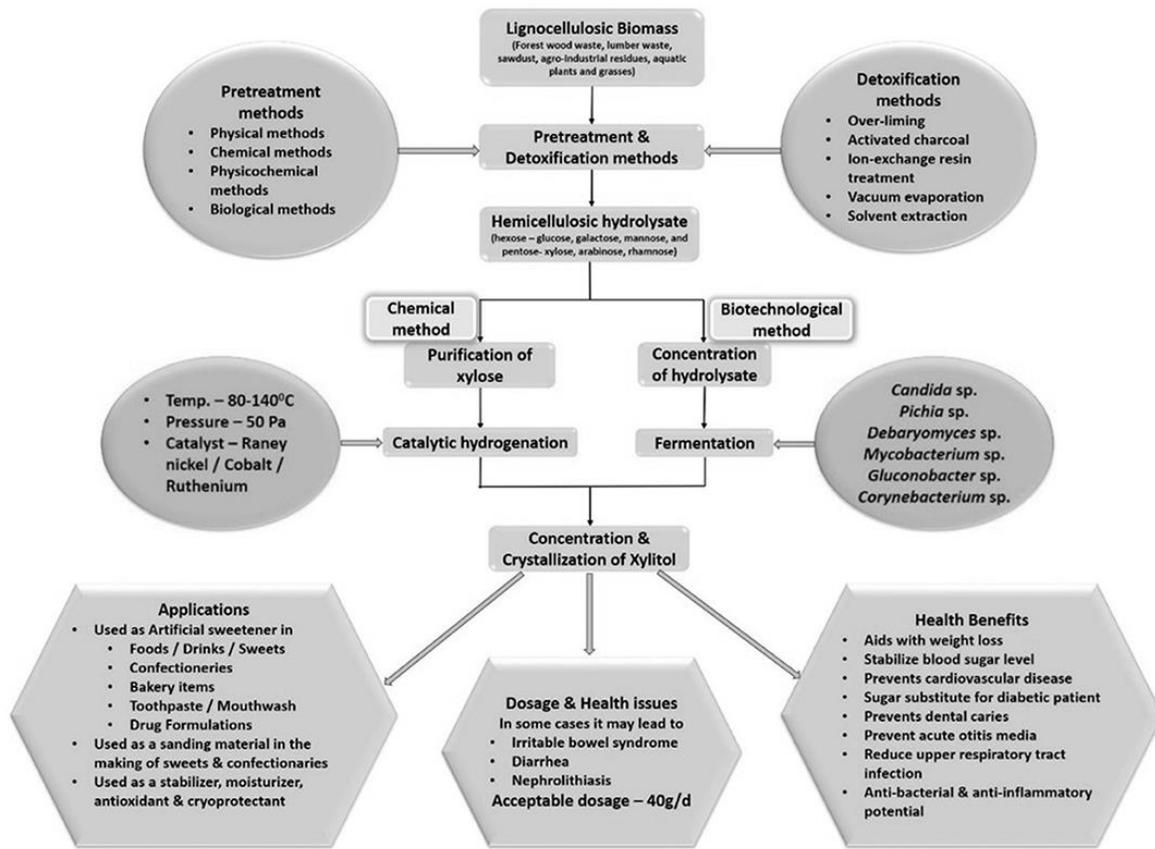


Figura 7. Estrategias de producción del xilitol y sus aplicaciones Tomada de: (Umai et al., 2022).

1.6. Mejoramiento del metabolismo de la xilosa en levaduras

1.6.1. Integración heteróloga de genes asociados con el metabolismo de la xilosa

Uno de los primeros enfoques para mejorar los rendimientos de producción de etanol y xilitol en levaduras fue la expresión heteróloga de proteínas. Los genes más usados para ser expresados heterológicamente han sido el *XYL1* y *XYL2* de *S. stipitis* y *XYLA* del hongo *Piromyces* sp. Como cepa huésped se ha usado desde cepas nativas de *Saccharomyces* hasta cepas sometidas a mutagénesis o con modificaciones genéticas como eliminación o sobreexpresión de genes involucrados en el metabolismo río abajo de la xilosa. Esta combinación de enfoques ha permitido la obtención de cepas que acumulan entre 2-8 veces etanol

y con velocidades de xilosa aumentadas entre 1.5 a 4 veces (Lee et al., 2012; Liu & Hu, 2010; Zhou et al., 2012).

A pesar de los diferentes intentos por expresar y modular la expresión de los genes *XYL1* y *XYL2* en *S. cerevisiae*, estos intentos han derivado en pérdida de carbono por acumulación de xilitol. Por ello, en los últimos 10 años se ha trabajado en expresar eficientemente la xilosa isomerasa de origen fúngico para evitar la acumulación de grandes concentraciones de xilitol al llevar la isomerización de la xilosa a xilulosa en un único paso (**Tabla 2**).

Tabla 2. Actividades de la xilosa isomerasa expresada heterológamente en *S. cerevisiae*.

Fuente de la enzima	Actividad XI (U/mg)	Rendimiento (g _{etanol} /g _{xilosa})	Referencia
<i>Orpinomyces</i> sp	0.780	0.317	Tanino et al. (2010)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	1.410	-	Aeling et al. (2012)
<i>Piromyces</i> sp	0.094	0.490	Lee et al. (2012)
<i>Piromyces</i> sp	0.044	0.438	Zhou et al. (2012)
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1.250	0.419	Peng et al. (2015)
<i>Piromyces</i> sp	0.250	0.409	
<i>Prevotella ruminicola</i>	0.893	0.412	Li et al. (2016)
<i>Orpinomyces</i> sp	0.834	0.409	
<i>Piromyces</i> sp	0.530	0.450	Zhang et al. (2019)

Derivado de todos los trabajos realizados para incorporar una ruta metabólica de la xilosa que sea eficiente para la producción de etanol; se han encontrado problemas de la expresión de *XYL1*, *XYL2* y *XYLA*, desbalance de cofactores, acumulación de xilitol, baja tasa de consumo de xilosa y acumulación de otros subproductos. Como alternativa se han usado otros sistemas de expresión como levaduras no *Saccharomyces* que de forma nativa son capaces de metabolizar xilosa y algunos disacáridos como la celobiosa. Por ejemplo, se han usado cepas de *K. marxianus*, *S. stipitis* y *S. shehatae* para la obtención de cepas evolucionadas con incrementos en sus productividades de etanol y xilitol, sumado a aumentos en sus velocidades

de consumo de xilosa y tolerancia a inhibidores de la fermentación. Esto ha incurrido en la reducción de los tiempos de proceso sumado que no se requiere conocer ampliamente la información genética del organismo para obtener un fenotipo de interés (Senatham et al., 2016; Wang et al., 2013; Watanabe et al., 2011).

1.6.2. Evolución adaptativa

A pesar de que las modificaciones genéticas han logrado incorporar rutas del metabolismo de la xilosa en otras levaduras, en la mayoría de los casos se requieren procesos adicionales que permitan la reducción de los tiempos de consumo de esta pentosa. Es por ello que han surgido alternativas que no impliquen el conocimiento total de la regulación del metabolismo o de la estructura genética de un organismo.

La evolución adaptativa o adaptación evolutiva, es un proceso que implica que el organismo se adapte o que presente mejoras en una condición que antes no toleraba. Lo anterior a través del continuo traspaso de un cultivo en medio “agotado” a un medio nuevo durante su fase exponencial de crecimiento. A través de la evolución adaptativa se han reducido los tiempos de fermentación debido al aumento de las velocidades de consumo del sustrato. Se ha asegurado la supervivencia de la levadura en presencia de inhibidores de la fermentación debido a la adaptación y, se han aumentado rendimientos como consecuencia de un mayor consumo de xilosa y otros azúcares presentes en los hidrolizados. En este sentido, diferentes autores han llevado a cabo procesos de evolución adaptativa o ingeniería evolutiva para aumentar velocidades de consumo de dicha pentosa y, rendimientos y productividades de etanol (Bianchini et al., 2022; Hemansi et al., 2022; Jiang et al., 2016; Sharma et al., 2017).

Dentro de las ventajas de la evolución adaptativas se encuentran la rapidez del proceso, los bajos costos y que no se debe conocer todo el perfil genético del organismo para obtener un fenotipo deseado. Por otro lado, la desventaja principal, es que, si el proceso de evolución no recae en una mutación puntual en el genoma,

si no en una adaptación temporal a la condición. El organismo podría perder la ventaja adquirida si sus condiciones ambientales son cambiadas (Gresham & Hong, 2015).

1.7. *Clavispora lusitaniae* CDBB-L-2031

Clavispora lusitaniae es una levadura ascomiceta que ha sido aislada de distintos hábitats como plantas y suelo (Lachance et al., 2003; Pérez-Brito et al., 2015). *C. lusitaniae* forma colonias blancas, circulares y elevadas. Sus células se observan ovaladas y con forma de limón (**Figura 8**). Además, fermenta celobiosa y otros celooligosacáridos de cadena corta, además mantiene hasta en 70%, su actividad hidrolítica a los 45 °C, exhibiendo su mayor actividad de bioconversión a los 37 °C (Chapla et al., 2015; Liu et al., 2013; Ochoa-Chacón et al., 2022). Un microorganismo que puede fermentar celobiosa y glucosa rápidamente como *C. lusitaniae*, es altamente valorada. Así mismo, resalta lo importante de utilizar cepas silvestres que permitan aumentar el aprovechamiento de la celobiosa, el rendimiento de etanol, y su tolerancia al mismo.

Se ha reportado que *Clavispora* sp., denominada NRRL Y-50464 utiliza celobiosa como única fuente de carbono y produce etanol en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas. Además, es una levadura tolerante a la mayoría de los inhibidores derivados del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica como 2-furaldehído (furfural) y 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (HMF) (Liu et al., 2013) Así mismo, *C. lusitaniae* asimila y crece en xilosa como única fuente de carbono bajo condiciones aerobias y microaerobias, aunque en esta última condición su consumo es más lento. Utiliza la ruta de oxido-reducción para la asimilación de la xilosa, dicha ruta involucra los genes *XYL1* y *XYL2*, que codifican para XR y XDH respectivamente. Se ha reportado que *C. lusitaniae* CDBB-L-2031 crece en mezclas de azúcares de glucosa-xilosa, glucosa-xilosa-celobiosa y celobiosa-xilosa, demostrando así el potencial de esta levadura para consumir y fermentar diferentes

tipos de azúcares que son encontrados en los sacarificados de biomasa lignocelulósica (Ochoa-Chacón et al., 2022).

En este sentido, *C. lusitaniae* es una levadura con un amplio potencial para ser usada como plataforma para la producción de bioetanol a partir de sacarificados de biomasa lignocelulósica. La glucosa en los hidrolizados presenta dos orígenes: el primero es cuando es acumulada directamente como resultado de la hidrólisis, y la otra forma es siendo el constituyente de la celobiosa y celooligosacáridos que pueden ser consumidos por algunas levaduras. Sin embargo, las pentosas tales como la xilosa que pueden llegar a representar el 20 % de la fracción de azúcares, no son consumidas rápidamente por *C. lusitaniae* y se presenta acumulación de xilitol. De esta forma, en este proyecto se propone el desarrollo de *C. lusitaniae* como levadura productora de etanol y xilitol, a través del uso de herramientas de ingeniería genética que permita la selección de una cepa con mejores características a nivel cinético en el consumo de xilosa, manteniendo sus propiedades fermentadoras de celobiosa y glucosa.

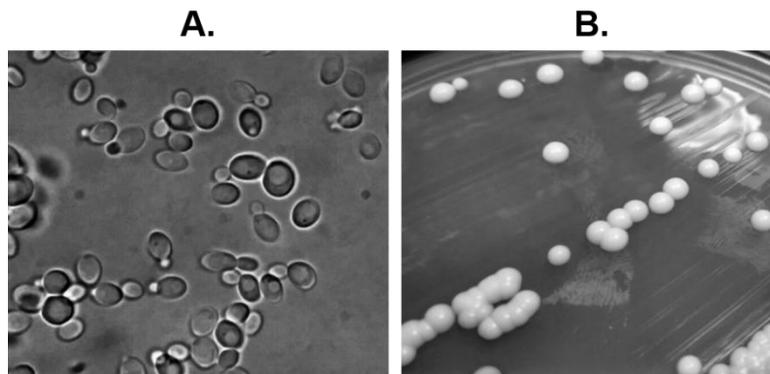


Figura 8. (A) *Clavispora lusitaniae* observada al microscopio y (B) crecimiento en placa de agar YPD.

2. JUSTIFICACIÓN

Dadas las necesidades energéticas a nivel mundial y particularmente de México, es prioritario desarrollar nuevos procesos de producción de bioetanol y mejorar los ya existentes. Para ello, los esfuerzos deben concentrarse en la búsqueda de nuevas cepas que tengan la capacidad de asimilar los azúcares presentes en los sacarificados de biomasa lignocelulósica. Así como el mejoramiento de éstas para incrementar los rendimientos de los procesos y su rentabilidad.

Los procesos de producción de etanol dependen principalmente del uso de *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, esta levadura de forma nativa no metaboliza los celo-oligosacáridos y la xilosa presente en los sacarificados de la biomasa lignocelulósica. En contraste, *Clavispora lusitaniae* CDBB-L-2031, levadura nativa de México aislada de mostos de mezcal en Oaxaca, posee la capacidad de producir etanol a partir de hexosas y celo-oligosacáridos. Esta capacidad de fermentar la mayoría de los azúcares presentes en los sacarificados es altamente deseada en los procesos de producción de etanol. Sin embargo, sólo posee una ruta de asimilación de xilosa que no lleva a etanol.

En este proyecto, se pretende obtener mediante técnicas de ingeniería genética y evolución adaptativa, una cepa mejorada de *C. lusitaniae* con mayor velocidad de consumo de xilosa, mayor acumulación de xilitol y capaz de producir etanol a partir de glucosa y celobiosa.

3. HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis 1

La evolución adaptativa en *Clavispora lusitaniae* CDBB-L-2031 permitirá la obtención de una cepa con mayor velocidad de consumo de xilosa y mayor acumulación de xilitol, dicha mejora estará asociada a cambios en los niveles de expresión de los genes del metabolismo de la xilosa

3.2. Hipótesis 2

El proceso de adaptación de *C. lusitaniae* en un medio con glucosa y xilosa no afectará su capacidad fermentativa de la glucosa y la celobiosa.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Obtener una cepa de *Clavispora lusitaniae* con características mejoradas en el metabolismo de la xilosa y, que, además, produzca etanol a partir de celobiosa y glucosa en condiciones de microaerobiosis.

4.2. Específicos

- 4.2.1. Obtener recombinantes de *C. lusitaniae* con el gen de la xilosa isomerasa integrado en su genoma.
- 4.2.2. Obtener cepas de *C. lusitaniae* con velocidad de consumo de xilosa aumentada y capacidad fermentativa.
- 4.2.3. Medir niveles de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de la xilosa en cepas de *C. lusitaniae* evolucionadas.
- 4.2.4. Producir etanol en los cultivos de las cepas mejoradas de *C. lusitaniae* en sacarificados lignocelulósicos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos empleados y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se utilizó *Clavispora lusitaniae* CDBB-L-2031. Las condiciones de crecimiento fueron 30 °C y 150 rpm en medios diferentes de acuerdo con el objetivo de los ensayos. Las células se reactivaron en medio YPD a partir de un cultivo conservado en glicerol al 50% como crioconservante a -70 °C.

Escherichia coli DH5 α se utilizó para replicar *in vivo* los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo. Las cepas se crecieron a 37 °C en caldo Luria Bertani o en placas de LB con 2 % de agar (Bioxon, Becton). Las cepas recombinantes se crecieron en LB adicionado con ampicilina (LB-Amp, 100 μ g/mL).

Saccharomyces cerevisiae 2-24D y *Scheffersomyces stipitis* CDBB-L-1518 fueron mantenidas en medio YPD a 30 °C y 150 rpm.

5.2. Medios de cultivo

5.2.1. Medio YP

Composición en g/L: extracto de levadura (10); peptona (20); fuente de carbono (10).

5.2.2. Medio YM

Composición en g/L: bactopectona (5); extracto de levadura (3); extracto de malta (3); glucosa (10).

5.2.3. Medio mínimo Breus

Composición en g/L: extracto de levadura (0.5); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05); fuente de carbono (10) (Breus et al., 2012).

5.2.4. Medio LB

Composición en g/L: peptona de caseína (10), extracto de levadura (5), NaCl (5).

5.2.5. Medio YNB

Solución 10X (100 mL): Medio YNB marca Difco (6.7 g), carbohidrato (5 g).

5.3. Preparación del inóculo

Se tomó una colonia de *C. lusitaniae* para inocular un matraz de 250 mL conteniendo 50 mL del medio YPD, se incubó durante 16 h a 30 °C y 150 rpm. Se tomó 10 % (v/v) de este pre-inóculo para inocular un segundo matraz con medio YPD y se incubó bajo las mismas condiciones durante 12 h. Posteriormente, las células se lavaron por centrifugación (8,000 rpm durante 10 min) tres veces con agua destilada estéril y finalmente fueron resuspendidas en medio Breus al volumen inicial.

5.4. Obtención de extracto crudo libre de células

Se centrifugaron 5-10 mL del cultivo a 8,000 rpm por 10 min para recuperar las células, posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. El botón celular se resuspendió en un microtubo de 1.5 mL con 400 μL de regulador de fosfatos 0.1 M pH 7.2. Se congeló la muestra a -20 °C por 30 min. Tras descongelar se agregaron 0.3 g de arena de vidrio y 150 μL 2-mercaptoetanol 0.1M. Se agitó en vórtex por 30 min a máxima velocidad. Finalmente, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante en otro tubo.

5.5. Cuantificación de proteína

Se agregaron 500 μL de NaOH 1 N, 450 μL de agua y 50 μL de muestra en un tubo de ensayo. Se llevó la mezcla a ebullición por 5 min y se enfrió en baño de agua. Se agregó 2.5 mL de reactivo C (50 mL de carbonato de sodio 5%, 1 mL de tartrato de sodio y potasio 2% y 1 mL de sulfato cúprico 1%). Se dejó reposar 10 min y se agregó 500 μL de reactivo de Folin (Sigma) 1 N y se mezcló vigorosamente en agitador vórtex. Se dejó reposar la reacción 30 min y se leyó absorbancia a 750 nm (espectrofotómetro Jenway 6320D). Se calculó la concentración contra una curva patrón de solución de albúmina de suero bovino de 0 a 300 μg (Lowry et al., 1951).

5.6. Determinación de actividad enzimática de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa

5.6.1. Determinación de actividad XR

La mezcla de reacción se hace en una celda de cuarzo y se lee la disminución de absorbancia dada por la oxidación del NADPH o NADH a 340 nm (espectrofotómetro Spectronic 21D) por 2 min. Mezcla de reacción (μL): regulador de fosfatos 0.1 M pH 7.2 (600), agua estéril (100), xilosa 0.1 M (100), NADPH 1.15 mM (100), extracto crudo (100) (Cocotle-Ronzon et al., 2011).

5.6.2. Determinación de actividad de XDH

La mezcla de reacción se hace en una celda de cuarzo y se lee el aumento de absorbancia dado por la reducción del NAD^+ a 340 nm (espectrofotómetro Spectronic 21D) por 2 min. Mezcla de reacción (μL): regulador Tris-HCl 0.05 M pH 7.2 (600), MgCl_2 100 mM (100), xilitol 40 mM (100), NAD 1 mM (100), extracto crudo (100).

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de NADPH o NADH en un minuto para XR, y la reducción de NAD^+ en el caso de XDH.

Para el cálculo de ambas actividades se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{1000 \times V_t \times \frac{dA}{dt}}{\varepsilon \times v \times CF}$$

Donde:

dA: absorbancia

dt: tiempo

V_t: volumen total de la celda

V: volumen del extracto utilizado

ε: coeficiente de extinción molar de NADPH y NAD para un paso de luz de 1 cm (6.22 L/mmol)

CF: factor de concentración

5.7. Cuantificación de sustratos y metabolitos

Los sustratos residuales y los productos de la fermentación se detectaron y cuantificaron por HPLC. Se inyectaron 20 µL de muestra previamente diluida con agua (1:5 o 1:10) y filtrada a través de una membrana acrodisco (φ 1.3 cm, tamaño de poro 0.45 µm, PALL). Se utilizó una columna Hi-plex H+ (300mm x 7.7mm) (Agilent) a 65 °C. El método empleado fue isocrático con un detector de índice de refracción (IR) a 50 °C y como fase móvil se utilizó una solución de ácido sulfúrico a 5 mM con un flujo de 0.6 mL/min. La concentración de cada compuesto fue calculada usando curvas estándar. Los tiempos de retención de cada compuesto fueron (min): celobiosa (9.6), glucosa (11.4), xilosa (12.4), xilitol (13.7) y etanol (24.5).

5.8. Extracción de DNA genómico de levaduras

Se concentraron 1.5 mL de cultivo celular y se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min. Se resuspendió el paquete celular en 200 µL de regulador de lisis (2% tritón X-

100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5) y se añadieron aproximadamente 200 μ L de perlas de vidrio. Adicionalmente, se añadieron 200 μ L de una mezcla 1:1 de fenol:cloroformo y se llevó a agitador vórtex a velocidad máxima durante 3-5 min. Posteriormente, se añadieron 200 μ L de regulador TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5) y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo de 1.5 mL y se añadieron 400 μ L de la mezcla 1:1 de fenol:cloroformo. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Para la precipitación del DNA genómico, se agregó 1 mL de etanol absoluto grado biología molecular (BM), se mezcló por inversión. Se centrifugó a 12000 durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el DNA en 400 μ L de regulador TE. Para eliminar el RNA de los ácidos nucleicos extraídos, se añadieron 30 μ L de RNAsa A (Thermo Fisher) (1mg/mL) y se incubó a 37 °C durante 15 min. Finalmente, para eliminar la enzima, se añadieron 10 μ L de acetato de sodio 3 M y 1 mL de etanol absoluto grado BM, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se evaporó el etanol a temperatura ambiente durante 30 min. El DNA purificado se resuspendió en 50 μ L de regulador TE o agua grado BM y se determinó la concentración en Nanodrop.

5.9. Extracción de RNA total de levaduras

Las células se recolectaron por centrifugación a 10000 rpm durante 5 min en microtubos de 1.5 mL, se elimina el sobrenadante por inversión del microtubo y, las células se resuspendieron en el medio residual por medio de agitador vórtex. Se añadieron 1-2 volúmenes de perlas de vidrio y se centrifugó a 10000 rpm durante 3 min. Posteriormente se añadieron 500 μ L de regulador de extracción (150 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM EDTA-NaOH pH 7.5, 4% SDS y 1% de β -mercaptoetanol) y se agitó con vórtex durante 1 min. Para la separación de ácidos ribonucleicos de proteínas, se añadieron 500 μ L de fenol equilibrado pH 4.5 y se llevó a agitador vórtex por 1 min, seguidamente se añadieron 200 μ L de cloroformo y se llevó a agitador vortex por 1 min. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min y se descartó el

sobrenadante y se agregaron 200 μL de cloruro de litio 10 M (1/3 del volumen de trabajo).

Finalmente, se precipitó el RNA a 4 °C durante 1 h o toda la noche (preferiblemente). Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 – 10 min y posteriormente, se agregó 1 mL de etanol 70 % grado BM; se resuspendió y centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Después se descartó el sobrenadante (etanol) y se dejó evaporar durante 30 min a temperatura ambiente. El RNA se resuspendió en 30 – 50 μL de agua grado BM.

Para eliminar el DNA genómico de 1 μg de RNA extraído, se añadió 1 U de DNAsa I-libre de RNAsas (Thermo Scientific EN0521), 1 μL de regulador 10X con MgCl_2 y agua grado BM hasta completar un volumen de 10 μL . La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Al terminar, se añadió 1 μL de EDTA 50 mM y se incubó a 65 °C durante 10 min. El RNA tratado con DNAsa se utilizó como templado para la síntesis de cDNA.

5.10. Purificación de DNA plasmídico de *Escherichia coli* DH5 α

Se creció *E. coli* DH5 α durante toda la noche a 37 °C y 150 rpm en medio LB suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina. Se recolectaron las células de 1.5 mL de cultivo a 10000 rpm durante 2 min. Se descartó el sobrenadante, se añadieron 200 μL de regulador P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNAsa A) y se resuspendió por medio de vortex. Se añadieron 250 μL de regulador de lisis P2 (0.2 M NaOH, 1% SDS) y se agitó por inversión del tubo 10 veces. Posteriormente, se añadieron 350 μL de regulador de neutralización N3 (4 M guanidina-HCl, 0.5 M acetato de potasio, pH 4.2) y se mezcló nuevamente por inversión del tubo 10 veces o hasta que se formara un precipitado. Se centrifugó el lisado a 10000 rpm durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a otro microtubo y se añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol (560 μL). La mezcla se incubó a -20 °C durante 15 min (mínimo) o durante toda la noche. Se transfirió la mezcla a una columna Qyagen ubicada en un microtubo nuevo. Se centrifugó a 7000 rpm durante 1 min. Se

descartó lo que pasó a través de la columna. Se añadieron 400 µL de regulador PE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, se añadieron 4 volúmenes de etanol antes de usar) a la columna y se centrifugó a 7000 rpm durante 1 min. Se descartó lo que pasó a través de la columna. Se repitió este último paso. Finalmente, se centrifugó de nuevo a 10000 rpm durante 2 min para remover los residuos del regulador de lavado. Se transfirió la columna a un microtubo nuevo, limpio y libre de nucleasas. Se añadieron 50 µL de regulador EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) y se centrifugó a 10000 rpm durante 1 min. El DNA plasmídico se cuantificó en Nanodrop.

5.11. Obtención de células calcio competentes de *E. coli*

Una colonia de *E. coli* DH5α se depositó en 2 mL de medio LB sin antibiótico, y se incubó a 37 °C, 200 rpm durante toda la noche. Con 500 µL del cultivo anterior, se inocularon 25 mL de medio LB (sin antibiótico) y se incubó a 200 rpm y 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (DO₆₆₀ nm) de aproximadamente 0.5. El cultivo se incubó en hielo durante 15 min, y se transfirió a tubos para centrifuga estériles y fríos. Se cosecharon las células por centrifugación 5 min a 8000 rpm, 4 °C y se decantó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 10 mL de una solución estéril de CaCl₂ 100 mM en Tris-HCl 10 mM, pH 8, y se reposaron en hielo 10 min. Se cosechan las células por centrifugación y se repite dos veces el paso anterior, con 5 mL de la solución fría y estéril de CaCl₂ 100 mM. La pastilla celular se resuspendió en aproximadamente 1.5 mL de la solución fría y estéril de CaCl₂ y las células se alicuotaron (100 µL) en microtubos nuevos y estériles. Las alícuotas se mantuvieron en hielo y se utilizaron de inmediato en los procesos de transformación.

5.12. Transformación de células calcio competentes de *E. coli*

Las células competentes obtenidas se transformaron por choque térmico. A las alícuotas de 100 µL de células se le adicionó aproximadamente 100 ng de DNAp. Para el control negativo se utilizaron 10 µL de agua libre de nucleasas, en lugar de

ADNp. Se homogenizó la mezcla cuidadosamente y se incubaron las células por 30 min en hielo. Los tubos se calentaron durante 1 min en un baño ajustado a 42 °C y se transfirieron de inmediato a hielo, se adicionaron 400 µL de medio LB líquido estéril, se homogenizaron los tubos por inversión y se incubaron durante 45 min a 37 °C. Con 100 µL de la suspensión de células transformadas, se sembraron por duplicado placas de LB+Amp y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se aislaron las colonias transformantes en placas con medio LB+Amp.

5.13. Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos

Se armó la cámara de electroforesis (BioRad) y se preparó un gel de agarosa al 1% con TAE y se dejó gelificar. Se cargó en los pozos 8 µL de regulador TAE 1%, 1 µL de muestra y 1 µL de reactivo para teñir (Amber DNA Fluorescent DNA Stain, Gel Company). Se cargó 1 µL del marcador de peso molecular (Plus DNA Ladder 1 kb con una concentración de 1 µg/µL) en vez de muestra. Se ajustó la corriente a 80 V, se dejó correr por 30 o 40 min en regulador TAE 1X. El reactivo para teñir tiene 3 colorantes para seguir la migración de los ácidos nucleicos: azul de bromofenol, cianol FF xileno y naranja G; cuando este último llegó al extremo del gel se detuvo la alimentación de corriente. El gel se observó en el fotodocumentador de geles (GelDoc de BioRad) con luz UV.

5.14. Electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes para RNA

Se armó la cámara de electroforesis (BioRad) y se preparó un gel de agarosa con MOPS y se dejó gelificar. Para la preparación del gel de agarosa de 100 mL de volumen al 1% se usaron: 10 mL MOPS 10X*, 1.2 g de agarosa, 87 mL de agua destilada estéril y 3 mL de formaldehído 37%. La agarosa se fundió en microondas exclusivamente con agua, posteriormente en campana de extracción se añadieron el MOPS y el formaldehído.

Para la preparación de las muestras de RNA se utilizó 1 mL de regulador de carga desnaturizante (μL): MOPS 10X (150), formaldehído 37% (176), formamida 100% (500), regulador de carga DNA 6X azul de bromofenol/xilencianol (165), 10 mg/mL bromuro de etidio (5). Por cada 1 μL de muestra se añadió 1.5 μL de regulador de carga desnaturizante.

El proceso de desnaturización de la muestra de RNA se hizo calentando la mezcla a 60 °C durante 10 min, posteriormente se bajó la mezcla al fondo del tubo en microcentrífuga y se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente para evitar la renaturalización.

El gel desnaturizante se corrió en regulador MOPS 1X** a 120 V durante 30 min.

*MOPS 10X (g/L): MOPS (41.86), acetato de sodio (6.8), EDTA.2xH₂O (3.72) o 10 mL EDTA 0.5 M pH 8.0.

** MOPS 1X: 100 mL MOPS 10X + 900 mL de agua destilada estéril.

5.15. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de DNA complementario se usó el kit First Strand DNAc Synthesis Kit (Thermo Scientific, #K1622) de acuerdo con las indicaciones del manual. Este kit posee una transcriptasa reversa recombinante (M-MuLV RT de Moloney Murine Leukemia Virus). Para la síntesis de cDNA se usaron 1 μg de RNA pretratado con DNAsa I durante 30 min a 37 °C.

5.16. PCR en punto final

La reacción de PCR punto final se llevó a cabo con los siguientes componentes de acuerdo con las recomendaciones en el kit de cDNA (μL): cDNA (1), 10X PCR regulador (1.25), MgCl₂ 20X (0.63), 10 mM dNTP (0.4); oligonucleótido directo 10

μM (0.4), oligonucleótido reverso 10 μM (0.3), Taq polimerasa 5 U/ μL (0.15), agua grado biología molecular 8.37, para un volumen final de 12.5 μL . Todos los componentes hacen parte del kit de PCR punto final de BioTecMol.

Se utilizaron las siguientes condiciones para realizar la reacción: desnaturalización inicial de 3 min a 95°C y 35 ciclos de 20 s de desnaturalización a 98 °C, 30 s de alineamiento al Tm óptimo (55°), 30 s de amplificación a 72 °C y por último una extensión final de 1 min a 72 °C (**Figura 9**).

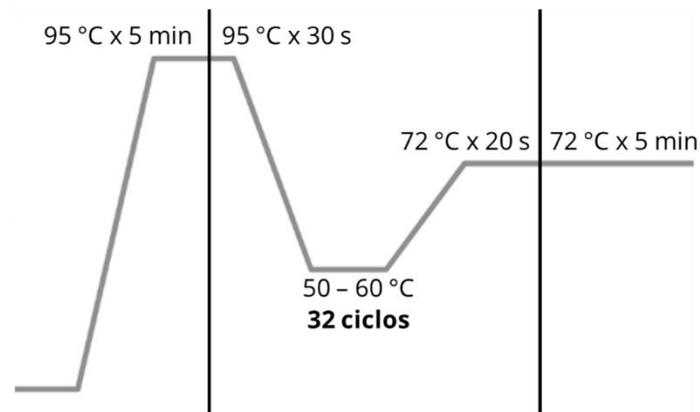


Figura 9. Ciclaje de la reacción de PCR punto final.

5.17. Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores se utilizó la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y *Candida* genome database (<http://www.candidagenome.org/>) para la identificación de las secuencias codificantes de los genes de interés en *C. lusitaniae*.

Posteriormente, se utilizó la herramienta Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/>) para el diseño de varios pares de cebadores.

Finalmente, cada par de cebadores fue evaluado con la herramienta Oligoanalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) para evaluar sus características de unión y seleccionar el más adecuado.

Se usaron cebadores para genes codificantes de transportadores (*GXS1*, *HXT1* y *XYLT*), de la fermentación (*PDC1*), del metabolismo superior de la xilosa (*XYL1*, *XYL2* y *XKS1*) y los controles endógenos (*ACT1* y *ADH1*). En las **Tabla 3** y **Tabla 4** se muestran las secuencias de los cebadores usados para los análisis realizados en este trabajo.

Tabla 3. Secuencias y características de los cebadores diseñados por (Santiago Benítez, 2017).

XR	Secuencia	Longitud	% GC	Tm(°C)
Directo (5'→3')	TCGACAACAAAACCTGTGCTGACC	24 pb	50	59.9
Reverso (5'→3')	TGGTTGTTGCAAGTATGGGTG	21 pb	48	55.8
Tamaño producto (pb)	527			
Inicio-Fin (pb)	65 - 591			
XDH	Secuencia	Longitud	% GC	Tm(°C)
Directo (5'→3')	CAAGCCCATGGTCATGGGCCAC	20 pb	64	63.4
Reverso (5'→3')	TCTGGCAACTTGACCAAGAAGTC	21 pb	48	57.3
Tamaño producto (pb)	163			
Inicio-Fin (pb)	174-336			
ACT	Secuencia	Longitud	% GC	Tm(°C)
Directo (5'→3')	GACAAGATCTTCATCAAGTAGTC	23 pb	39	50.8
Reverso (5'→3')	TCTACAACGAATTGAGAGTTGC	22 pb	41	52.9
Tamaño producto (pb)	313			
Inicio-Fin (pb)	578-890			

Tabla 4. Secuencias y características de los cebadores diseñados en este trabajo.

Clu_Gxs1	Secuencia	Longitud	% GC	Tm(°C)
Directo (5'→3')	TGCCAGTTACAGAATCCCTC	20 pb	50	54.3
Reverso (5'→3')	CTCTTCAACCAAGTCAGGGT	20 pb	50	54.4
Tamaño producto (pb)	181			
Inicio-Fin (pb)	567 - 747			
Clu_Hxt1	Secuencia	Longitud	% GC	Tm(°C)
Directo (5'→3')	AACTGGATGTGGGGTTTCTT	20 pb	45	54.3
Reverso (5'→3')	TTCAAGAGATGGTGGAAACCC	20 pb	50	54.5
Tamaño producto (pb)	225			
Inicio-Fin (pb)	1360-1584			
Clu_XylT	Secuencia	Longitud	% GC	Tm(°C)
Directo (5'→3')	CCACGGATTTTTCCCTGAAC	20 pb	50	54
Reverso (5'→3')	GGAGTTGCCAAAGTTGTCTC	20 pb	50	53.9
Tamaño producto (pb)	209			
Inicio-Fin (pb)	131-339			
Clu_Xks1	Secuencia	Longitud	% GC	Tm(°C)
Directo (5'→3')	TTATTGGTCAAAGCCGCAG	20 pb	45	53.8
Reverso (5'→3')	AGCCTGTGAATCTGTAGTGG	20 pb	50	54.2
Tamaño producto (pb)	215			
Inicio-Fin (pb)	306-520			
Clu_Adh1	Secuencia	Longitud	% GC	Tm(°C)
Directo (5'→3')	GCAAGGACATTGTTGCTGAT	20 pb	45	53.8
Reverso (5'→3')	TACCGACGTAAGAACCACAG	20 pb	50	54
Tamaño producto (pb)	219			
Inicio-Fin (pb)	673-891			
Directo (5'→3')	Secuencia	Longitud	% GC	Tm(°C)
Reverso (5'→3')	GGTGAGTTGTCTGCCTTGAA	20 pb	50	55.2
Tamaño producto (pb)	TCTCCTTTGGAGCAGAGTCA	20 pb	50	55.5
Inicio-Fin (pb)	217			
Directo (5'→3')	229-445			

5.18. PCR en tiempo real

Para realizar la cuantificación de la expresión relativa de los genes *XYL1*, *XYL2*, *XKS1*, *HXT1*, *GXS1* y *XYLT* se utilizó el método comparativo de Ct, el cual se define como el número de ciclo en el que se detecta fluorescencia significativa por encima del umbral de detección del equipo utilizado para realizar qPCR. Actina (*ACT1*) y alcohol deshidrogenasa (*ADH1*) fueron los controles endógenos y las variables fueron las cepas, tiempo de cultivo y diferentes fuentes de carbono. El método comparativo de Ct se calcula con la siguiente ecuación:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = [(Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ control}) \text{ condición A} \\ - (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ control}) \text{ condición B}]$$

Para llevar a cabo las reacciones de PCR en tiempo real, se usó como molde cDNA usando el kit de KAPA SYBR FAST One-step qRT-PCR (KAPA Biosystem), se siguieron las indicaciones del kit para preparar las reacciones (μL): cDNA (1), KAPA SYBR FAST qPCR master mix 2X (10), 10 mM dUTP (0.4), cebador directo 10 μM (0.4), cebador reverso 10 μM (0.4), 50X ROX Low (0.4), agua grado biología molecular (7.4), para un volumen final de 20 μL .

Se utilizaron las siguientes condiciones para realizar la reacción: activación de la enzima de 3 min a 95 °C y 40 ciclos de 20 s de desnaturalización a 95 °C; 20 s de alineamiento al T_m óptimo (58°), 30 s de amplificación a 72 °C; en este paso se llevó a cabo la colección de datos. El paso final de la reacción fue la curva de fusión determinada por el equipo (Applied Biosystem 7500).

5.19. Evolución adaptativa

Se llevó a cabo un proceso de evolución adaptativa con el objetivo de mejorar el consumo de xilosa y lograr co-consumo de glucosa y xilosa por parte de *C. lusitaniae*, basados en algunos trabajos previos de evolución con *K. marxianus* (Sharma et al., 2016, 2017). El proceso de evolución se hizo en medio mínimo Breus suplementado con concentraciones crecientes de glucosa, manteniendo la concentración de xilosa (2%) a 30 °C y 150 rpm en matraces de 125 mL (**Figura 10a**).

La evolución adaptativa de *C. lusitaniae* en condiciones aerobias se realizó en matraces de 125 mL con un volumen de trabajo de 25 mL, el experimento se realizó por triplicado. La evolución se inició con una relación de xilosa:glucosa de 2:0.1, cuando se llegó a la mitad del crecimiento exponencial se tomaron 100 µL de cultivo como inóculo para el siguiente paso. El proceso se repitió hasta alcanzar una relación de 2:1 de xilosa:glucosa. El proceso de evolución adaptativa también se llevó a cabo en condiciones limitadas de oxígeno, manteniendo las mismas condiciones de temperatura y agitación (**Figura 10b**). En condiciones aerobias se obtuvieron 30 generaciones y en condiciones limitadas de oxígeno, sólo se lograron alcanzar 5 generaciones.

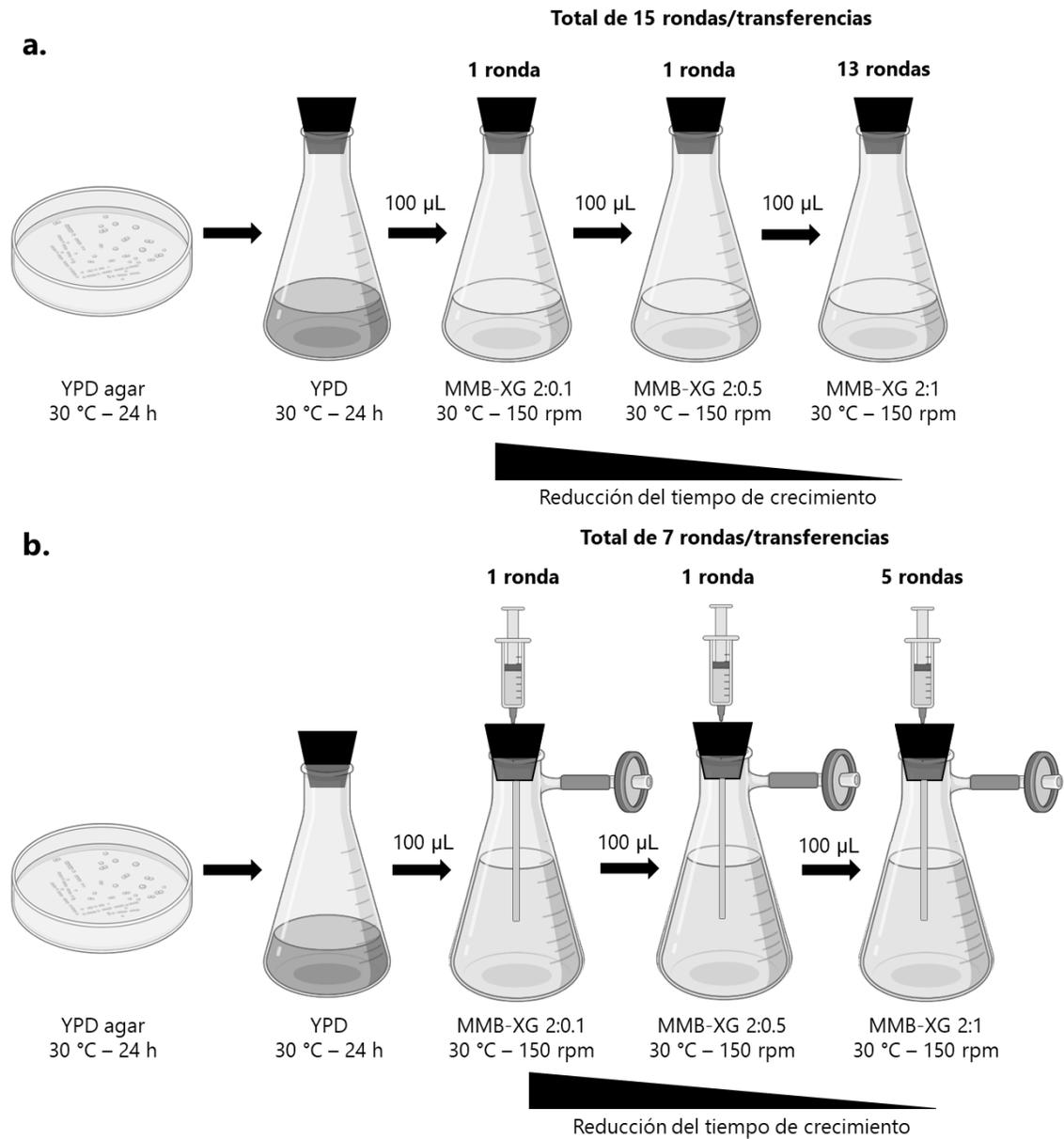


Figura 10. Proceso de evolución de *C. lusitaniae* CDBB-L-2031 en condiciones aerobias (a) y en condiciones limitadas de oxígeno (b) en MMB suplementado con xilosa y glucosa a 30 °C y 150 rpm

5.20. Sacarificación enzimática de bagacillo de caña

Para el proceso de sacarificación se utilizó como biomasa lignocelulósica el bagacillo de caña de azúcar pretratado con NaOH.

5.20.1. Pretratamiento del bagacillo de caña de azúcar (BGC)

El pretratamiento alcalino del BGC se llevó a cabo a una relación de 100 g de bagacillo seco por cada litro de solución de NaOH al 2%. El tratamiento se llevó a cabo en un recipiente plástico y se le inyectó vapor de agua a 88 °C durante 15 min. El bagazo pretratado se lavó con agua de la llave hasta alcanzar un pH cercano al neutro (7), se secó a temperatura ambiente y se molió mecánicamente para disminuir el tamaño de partícula y favorecer su sacarificación.

5.20.2. Diseño central compuesto

Se llevó a cabo un diseño central compuesto para evaluar la influencia de la actividad enzimática del coctel en polvo Celluclast BG (Novozymes) y de la temperatura sobre el proceso de sacarificación. Para ello, se usó el programa Design Expert v.11. En la **Tabla 5** se muestran los niveles evaluados para cada factor.

Tabla 5. Diseño central compuesto para ensayo de sacarificación de BGC.

Corrida	Factor 1	Factor 2
	Unidades de papel filtro (FPU)*	Temperatura (°C)
1 ^a	55.0	50
2	10.0	60
3 ^a	55.0	50
4	100.0	40
5	55.0	64
6 ^a	55.0	50
7 ^b	8.6	50
8	10.0	40
9	55.0	36
10 ^c	118.7	50
11	100.0	60

^aPuntos centrales, ^bpunto axial bajo, ^cpunto axial alto.

*FPU totales en un volumen de 25 mL y 0.5 g de bagacillo de caña

Una vez definidas las condiciones de las corridas, los experimentos se llevaron a cabo en matraces de 125 mL con 25 mL de volumen de trabajo (2% de BGC en

regulador 25 mM citratos pH 4.8) a 150 rpm. Posteriormente se midieron los azúcares liberados por medio de HPLC, siguiendo el procedimiento mencionado en el apartado 5.8.

5.20.3. Sacarificación de BGC para fermentaciones

Se llevó a cabo la sacarificación del BGC en reactores (Applikon) de 3 L con un volumen de trabajo de 2 L. Se usó regulador citratos 25 mM y pH 4.8 como medio líquido y 2% de BGC como sólidos en suspensión. Se resuspendió la enzima (Celluclast) BG manteniendo una relación de 55 FPU/g BGC. La enzima presentó una actividad de 90 FPU/g enzima. La sacarificación se realizó a 50 °C y 100 rpm durante 12 h.

5.20.4. Clarificado del sacarificado

Tras las 12 h de sacarificación, el hidrolizado se refrigeró durante 24 h para favorecer la precipitación de los sólidos en suspensión y de los coadyuvantes de la enzima. Se procedió a centrifugar el hidrolizado a 8000 rpm para separar el clarificado de los sólidos. Finalmente, se esterilizó por autoclave el sacarificado a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 min.

5.21. Producción de etanol y xilitol

Las cinéticas de producción se llevaron a cabo en reactores Applikon my-control de 0.5 L con 0.4 L de volumen de trabajo en condiciones microaerofílicas (0.5 vvm) con una agitación de 200 rpm a 30 °C durante 48 h. Se usó medio mínimo Breus suplementado con 30 g/L de azúcares totales de los sacarificados de BGC.

Para los experimentos de efecto de la concentración de xilosa sobre las cepas evolucionadas se llevaron a cabo las cinéticas en matraces de 1 L con un volumen de trabajo de 0.25 L con medio mínimo Breus a 150 rpm y 30 °C durante 24 – 48 h.

Se tomaron muestras periódicas de acuerdo con las necesidades del experimento: cada 2-3 h durante las primeras 12 h del experimento. Posteriormente, cada 6 h

hasta cumplir 48 o 72 h. Las muestras fueron analizadas por medio de HPLC de acuerdo con lo mencionado en el apartado 5.8.

5.22. Tolerancia de *C. lusitaniae* a diferentes concentraciones de etanol y xilosa

Se llevó a cabo la evaluación de la tolerancia a etanol de *C. lusitaniae* y Clu_Ev3 con el fin de conocer cuáles son los niveles máximos tolerables por dichas cepas sin que se vea afectada su viabilidad. Para cada caso, se creció *C. lusitaniae* y Clu_Ev3 en medio YPD durante 16 h y se llevó a cabo la incubación de las cepas a diferentes concentraciones de etanol (1, 5 y 10 %) durante 1 h. Tras este periodo de incubación, se llevaron a cabo diluciones seriadas y siembras en placa por extensión y por goteo.

Para la evaluación a diferentes concentraciones de xilosa (1 – 5%), se llevó a cabo la incubación de *C. lusitaniae* wt y Clu_Ev3 en diferentes concentraciones de xilosa a 30°C durante 48 h.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6.1. Etapa 1: Obtención de cepas mejoradas de *Clavispora lusitaniae*

- 6.1.1. Construcción *in silico* del vector de expresión para *C. lusitaniae*
- 6.1.2. Diseño de los cebadores para la construcción del vector
- 6.1.3. Evaluación de las temperaturas de alineamiento de los cebadores
- 6.1.4. Amplificación y ensamblaje de los fragmentos del vector
- 6.1.5. Transformación de *C. lusitaniae*
- 6.1.6. Evaluación de las cepas transformadas por medio de selección antibiótica, PCR y restricción

6.2. Etapa 2: Obtención de cepas evolucionadas de *Clavispora lusitaniae*

- 6.2.1. Evolución adaptativa en medio mínimo Breus con xilosa y glucosa
- 6.2.2. Evaluación de las cepas evolucionadas y comparación de sus parámetros cinéticos
- 6.2.3. Comparación de las actividades enzimáticas de XR y XDH en las cepas evolucionadas
- 6.2.4. Selección de la mejor cepa en función de su capacidad de acumular etanol y xilitol

6.3. Etapa 3: Análisis de los niveles de expresión de genes asociados al metabolismo de la xilosa

- 6.3.1. Diseño y evaluación de los cebadores para los genes a evaluar
- 6.3.2. Estandarización de las condiciones de amplificación para cada gen de estudio
- 6.3.3. Medición de los niveles de expresión de los genes seleccionados

6.4. Etapa 4: Producción de etanol y xilitol a partir de sacarificados

- 6.4.1. Pretratamiento del bagacillo de caña
- 6.4.2. Diseño central compuesto para sacarificación de bagacillo de caña

6.4.3. Sacarificación del bagacillo de caña

6.4.3. Fermentación usando como sustrato bagacillo de caña con las cepas wt y evolucionada

6.4.4. Análisis comparativo del desempeño de las cepas de estudio vs cepas modelo

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo I: Obtener recombinantes de *C. lusitaniae* con el gen de la xilosa isomerasa integrado en su genoma

7.1. Elección del marcador de selección para *C. lusitaniae*

Actualmente, la mayoría de los plásmidos diseñados para mejorar genéticamente levaduras son dirigidos específicamente a *S. cerevisiae* y éstos regularmente presentan un marcador de selección por auxotrofia (*URA3*, *LEU2* y *TRP1*). Por lo anterior, con el fin de conocer si estos genes podrían ser usados como marcadores de selección durante los procesos de manipulación genética de *C. lusitaniae* CDBB-L-2031, se realizaron pruebas de auxotrofia a uracilo y leucina.

Los resultados mostraron que *C. lusitaniae* CDBB-L-2031 en su forma nativa es protótrofa para uracilo y leucina (**Figura 11**). Es decir, que la auxotrofia a uracilo o leucina no podría ser usada como marcador de selección para los mismos, por lo cual la búsqueda fue direccionada en encontrar un compuesto antifúngico que pudiera ser usado para este fin.

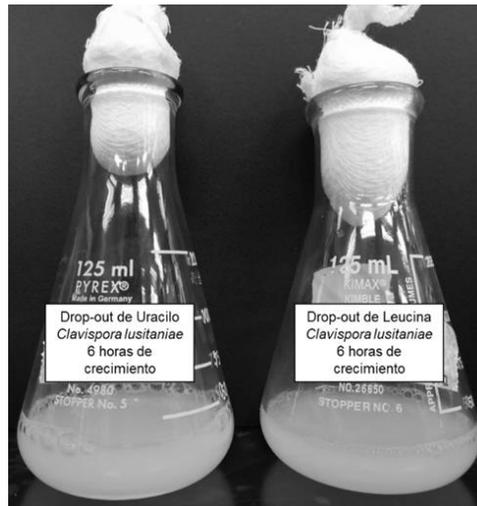


Figura 11. Crecimiento de *C. lusitaniae* durante 6 h en medio SD con extracto levadura libre de aminoácidos suplementado con drop-out de uracilo (izquierda) y leucina (derecha).

7.2. Pruebas de sensibilidad de *C. lusitaniae* a antifúngicos

C. lusitaniae es un teleomorfo de *Candida lusitaniae*, la cual es una levadura que ha sido ampliamente reportada como cepa clínica resistente a antifúngicos (Arendrup & Patterson, 2017; Asner et al., 2015; Demers et al., 2018), por dicha razón se decidió llevar a cabo pruebas de sensibilidad de la cepa con el fin de asegurar el uso seguro de la levadura en el ambiente de laboratorio. Los antifúngicos usados fueron: Anfotericina B, Fluconazol y Caspofungina de acuerdo con lo estipulado por la CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) en el manual M27-A3 por medio del método de microdilución para levaduras.

El método de microdilución explica cómo deben prepararse las soluciones patrón de cada antifúngico y cómo mediante diluciones seriadas se puede llegar a las concentraciones mínimas y máximas dictaminadas por el manual M27-A3 como concentraciones para el análisis de sensibilidad en microplacas de 96 pozos. Para ello, *C. lusitaniae* fue cultivada por 24 h en medio PDA a 37 °C, junto con las cepas control del experimento: *Candida krusei* ATCC 14423 (cepa resistente), *Candida glabrata* CBS 138 (cepa sensible), *Candida glabrata* CGL 43 (aislado clínico resistente) con el fin de conocer cuánto crecía cada cepa al mismo tiempo de incubación a temperatura corporal promedio demostrando su capacidad infecciosa (**Figura 12**). Posteriormente, se tomaron colonias de cada cepa y en un tubo con solución salina se ajustó entre 0.45 – 0.60 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, para obtener una concentración entre $1 \cdot 10^6$ – $5 \cdot 10^6$ UFC/mL.

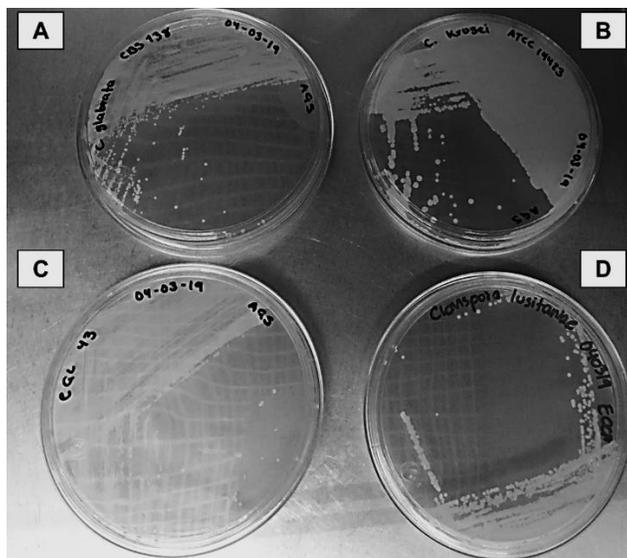


Figura 12. Crecimiento de: (A) *C. glabrata* CBS 138. (B) *C. krusei* ATCC 14423. (C) *C. glabrata* CGL 43. (D) *C. lusitanae* CDBB-L-2031 después de 24 h en placa con medio PDA.

Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas con medio RPMI 1:10, 1:100 y 1:1000 para obtener una concentración entre $1 \cdot 10^3 - 5 \cdot 10^3$ UFC/mL. Esta última fue la concentración de trabajo para inocular las placas en donde las levaduras quedarán a una concentración en cada pozo entre $0.5 \cdot 10^3 - 2.5 \cdot 10^3$ UFC/mL.

Las concentraciones de los antibióticos en las placas fueron: Anfotericina B y Caspofungina (0.06 – 32 $\mu\text{g/mL}$) y Fluconazol (0.25 – 128 $\mu\text{g/mL}$) (pozos del 2 – 11), en los pozos 1 se mantuvo el control de crecimiento y en los pozos 12 el control de esterilidad (**Figura 13**). Para cada cepa se realizaron 4 réplicas en cada antifúngico.

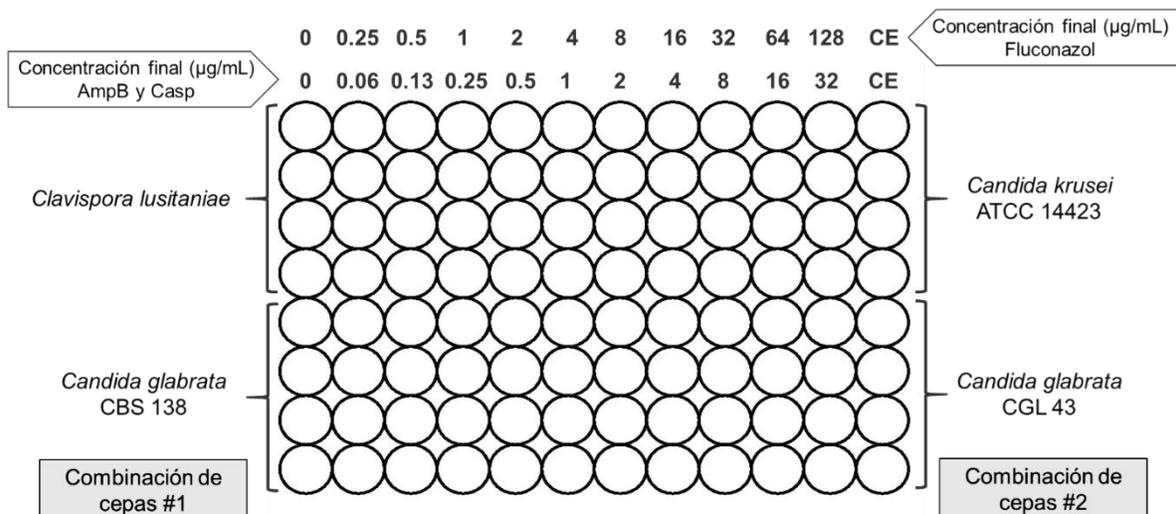


Figura 13. Esquema general de las concentraciones finales de los antifúngicos en la placa de 96 pozos y la distribución de las cepas usadas. Por placa se evaluaron dos cepas distintas: en la primera *C. lusitanae* CDBB-L-2031 y *C. glabrata* CBS 138 y, en la segunda *C. krusei* ATCC 14423 y *C. glabrata* CGL 43. Para evaluar los antibióticos se usó un antibiótico por placa. Las concentraciones evaluadas para AmpB y Caspofungina fueron 0 – 32 µg/mL, en el caso del fluconazol se evaluaron las concentraciones 0 – 128 µg/mL. CE corresponde al control de esterilidad.

Los datos obtenidos mostraron que *C. lusitanae* es una cepa sensible a los antifúngicos evaluados de acuerdo con la CLSI, ya que en concentraciones menores o iguales a 8 µg/mL su crecimiento es reducido respecto al control de crecimiento (**Figura 14**).

En el caso de *C. krusei* ATCC 14423 la CLSI reporta puntos de corte a las 24 y 48 horas para cada uno de los antifúngicos usados. Para corroborar que el comportamiento fuera similar a lo reportado se evaluaron los puntos de corte a las 24 h. En Anfotericina B se reporta la concentración mínima inhibitoria entre 0.5 – 2 µg/mL, en Caspofungina entre 0.12 – 1 µg/mL y en Fluconazol entre 8 – 64 µg/mL. De acuerdo con lo observado en la (**Figura 14**), la cepa de *C. krusei* si presenta dicho comportamiento, apuntando a que el ensayo se llevó a cabo adecuadamente.

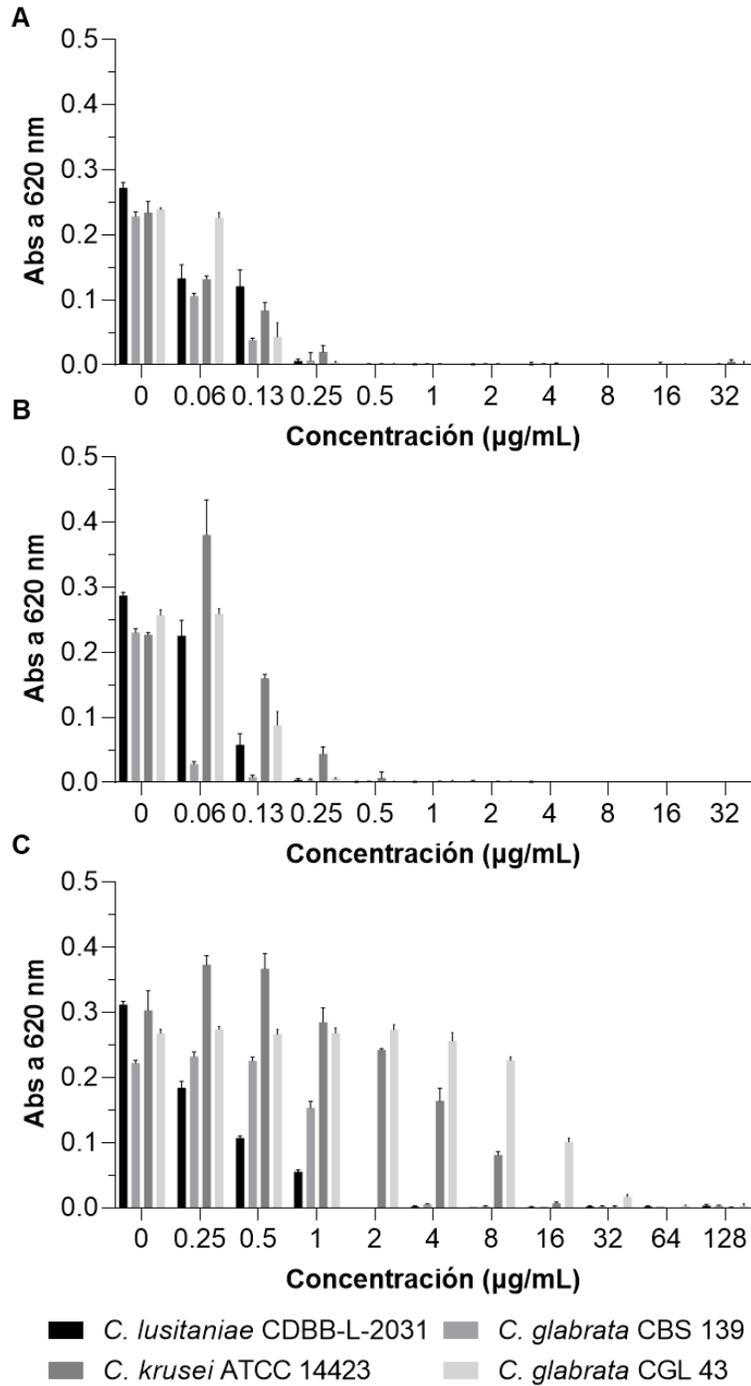


Figura 14. Crecimiento de las levaduras evaluadas en diferentes concentraciones de (A) Anfotericina B (B) Caspofungina (C) Fluconazol después de 24 h de incubación a 37 °C.

El experimento de sensibilidad se llevó a cabo con el fin de conocer la sensibilidad de *C. lusitaniae* a algunos antifúngicos y escoger un marcador de selección. Debido

a que la mayoría de las levaduras del género *Candida* presentan mecanismos de resistencia que están asociados a mutaciones en los genes blanco de la acción de los antifúngicos, sobreexpresión de los genes de los transportadores CDR y de las bombas de flujo al exterior de la levadura, se decidió elegir un marcador de selección que actúe más eficientemente (Dunkel et al., 2008; Sanglard, 2016; Vincent et al., 2013). Todos estos mecanismos de resistencia han sido presentados por cepas clínicas de pacientes que han estado bajo tratamiento con antifúngicos por largos periodos de tiempo (Morio et al., 2012).

Así mismo, los antifúngicos como el fluconazol actúa inhibiendo la citocromo P-450, lo que interrumpe la conversión de lanosterol a ergosterol y como consecuencia causa la ruptura de la membrana celular (Pasko et al., 1990). Por otro lado, la caspofungina bloquea la síntesis de β -1,3-D-glucano de la pared celular, inhibiendo la enzima β -1,3-D-glucano sintasa, afectando la síntesis de pared y evita la multiplicación del microorganismo (Letscher-Bru & Herbrecht, 2003). Debido a que estos antifúngicos ejercen su acción inhibiendo enzimas de forma competitiva y no competitiva, perderían el efecto en presencia de una mayor producción de enzima o si el medio se diluye, por lo que ante diferentes cambios durante la presión de selección podrían arrojar falsos positivos. Derivado de lo mencionado anteriormente, se planteó, para fines de este proyecto, usar como marcador de selección el gen que codifica para la N-acetil transferasa (*NAT1*), que confiere resistencia a la nourseotricina (GenBank: X73149.1) inactivando la nourseotricina (NTC). La NTC es un antibiótico de amplio espectro que inhibe la síntesis de proteínas induciendo errores de codificación. La NTC ha sido usada como marcador de selección en bacterias, levaduras, hongos filamentosos y células vegetales (Defosse et al., 2018; Kochupurakkal & Iglehart, 2013; Lehman et al., 2016; Obinata et al., 2018).

7.3. Evaluación de la sensibilidad a nourseotricina de *C. lusitaniae*

Para determinar a qué concentración de nourseotricina es sensible *C. lusitaniae*, se realizó una revisión acerca del uso de este antibiótico con otras levaduras del género *Candida* y levaduras de uso común para manipulación genética (**Tabla 6**). Al observar que las concentraciones de selección estaban entre los 100 µg/mL hasta 450 µg/mL, se probaron diferentes valores entre estos dos límites para determinar si *C. lusitaniae* crecía o no.

Tabla 6. Concentraciones de nourseotricina reportadas para la selección de levaduras recombinantes.

Levadura	Concentración para selección (µg/mL)	Fuente
<i>C. albicans</i>	200 - 450	Shen et al. (2008)
<i>C. kefir</i>	450	
<i>Candida lusitaniae</i>	100 – 450	
<i>C. glabrata</i>	100 – 200	
<i>Pichia pastoris</i>	50 – 200	Jacobs et al. (2009)
<i>C. albicans</i>	200	Milne et al. (2011)
<i>S. cerevisiae</i>	50 – 200	Alshahni et al. (2010)
<i>C parapsilosis</i>	400	Gonia et al. (2015)
<i>C. albicans</i>	400	Min et al. (2016))
<i>S. cerevisiae</i>	200	Verwaal et al. (2017)
<i>C. albicans</i>	200	Nguyen et al. (2017)
<i>C. parapsilosis</i>		
<i>C. metapsilosis</i>	200	Lombardi et al. (2019)
<i>C. tropicalis</i>		

Se preparó medio YNB-X sólido con 0, 100, 150, 200 y 450 µg/mL de nourseotricina adicionados al medio y se sembraron por dispersión 100 µL de una dilución de 10⁻⁵ de un cultivo de 16 h de *C. lusitaniae*, se incubó a 30 °C durante 72 h. Como

resultado, se observó que a partir de los 100 µg/mL del antibiótico no había presencia de UFC de la levadura, en el control se contaron 102 UFC en 100 µL de cultivo al finalizar el experimento (**Tabla 7**). De esta forma se logró confirmar que la concentración mínima inhibitoria de nourseotricina para *C. lusitaniae* en medio sólido es 100 µg/mL, siendo la concentración mínima que podía ser usada como marcador de selección en el proceso de obtención de recombinantes.

Tabla 7. Colonias de *C. lusitaniae* presentes en medio YNB-X adicionado con diferentes concentraciones de nourseotricina (NTC).

Concentración de NTC (µg/mL)	UFC
0	102
100	0
150	0
200	0
400	0

A raíz de que se deseaba cubrir el espectro de concentraciones de nourseotricina menores a los 100 µg/mL para determinar la sensibilidad de *C. lusitaniae*. Se ajustó el ensayo de microdilución de la CLSI M-27 para poder realizar el análisis de sensibilidad a este antibiótico en microplacas de 96 pozos. Para el desarrollo de esta prueba se usaron placas de 96 pozos, cada pozo con un volumen de trabajo de 200 µL, donde: 100 µL corresponden a la levadura en una dilución 10^{-3} de un cultivo con OD₆₀₀ inicial 0.5 (~1-5 células/mL) y los otros 100 µL corresponden al antibiótico con concentraciones finales de 0 – 128 µg/mL (**Figura 15**). Tanto el inóculo como el antibiótico estaban en el medio de crecimiento YNB-X. Se incubó a 30 °C a 200 rpm durante 48 h. Las lecturas se realizaron por triplicado a las 0, 24 y 48 h de cultivo midiendo cambio de OD₆₀₀ en el equipo CLARIOstar Plus de BMG Labtech (Ortenberg, Alemania).

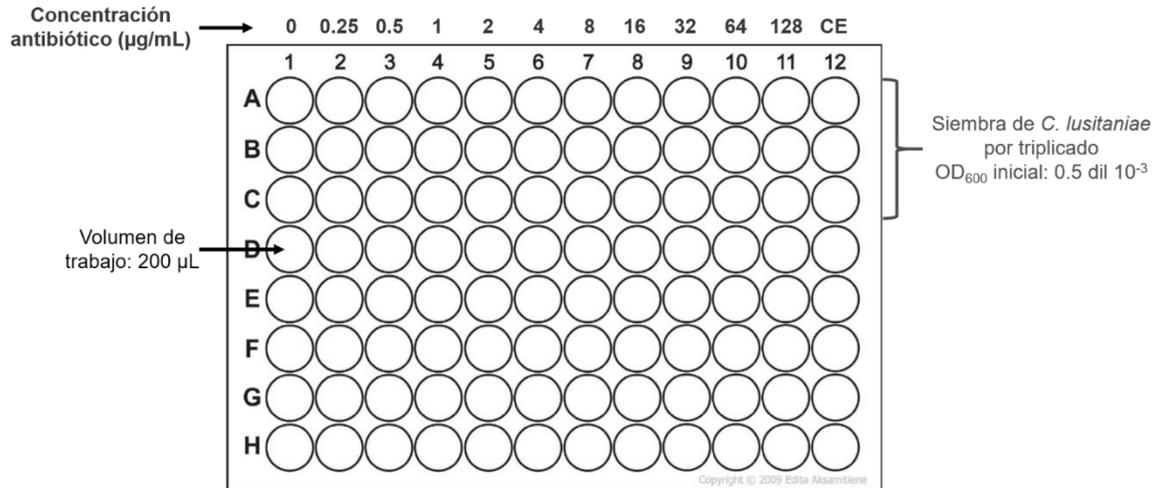


Figura 15. Ensayo de sensibilidad de *C. lusitaniae* a diferentes concentraciones de nourseotricina en medio YNB-X, 30 °C, 200 rpm. Se usaron concentraciones de nourseotricina desde 0 – 128 µg/mL. CE corresponde al control de esterilidad.

De acuerdo con los resultados, *C. lusitaniae* es sensible a nourseotricina en concentraciones iguales o mayores a 2 µg/mL en medio YNB-X líquido tras 24 y 48 h de incubación. De acuerdo con el análisis estadístico de ANOVA de dos vías con prueba de Tukey con $\alpha=0.05$, tanto el tiempo como la concentración de antibiótico tienen efecto sobre el crecimiento de *C. lusitaniae* ($p \leq 0.05$). Cuando se evaluó el factor tiempo, el tiempo de 48 h fue el que presentó diferencia significativa en comparación a las 0 h ($p \leq 0.001$) (**Figura 16**).

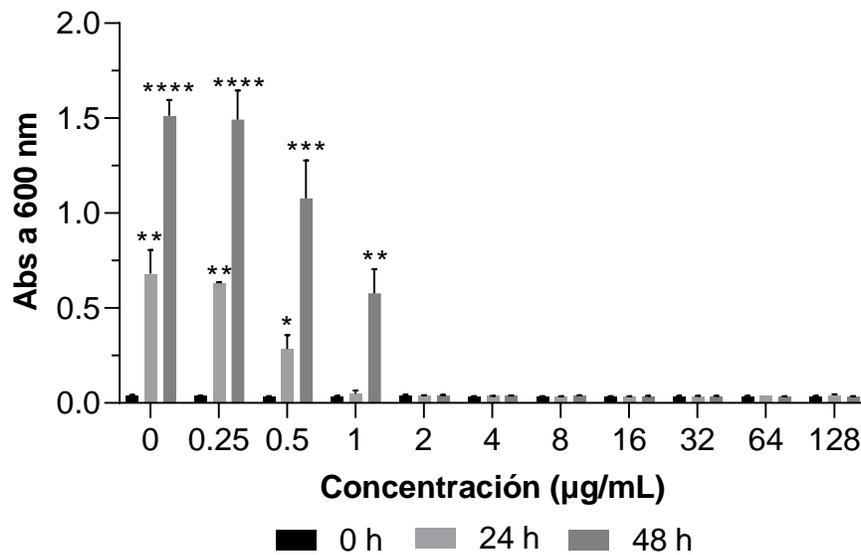


Figura 16. Análisis de sensibilidad de *C. lusitaniae* a diferentes concentraciones de nourseotricina.

En comparación con otras levaduras del género *Candida*, *Clavispora lusitaniae* es más sensible a nourseotricina. Por ejemplo, con *Candida albicans* se han usado concentraciones para selección entre los 200 – 450 µg/mL y, con *Candida glabrata* concentraciones de 100 – 200 µg/mL. Por otro lado, con el anamorfo de *Clavispora lusitaniae*, *Candida lusitaniae* se ha reportado el uso de concentraciones de 100 – 450 µg/mL para la selección de recombinantes (**Tabla 6**). Para fines del proyecto, el uso de un antibiótico como la nourseotricina en el que se requieran bajas concentraciones para selección de recombinantes, resulta en un ahorro dado el costo de éste.

7.4. Establecimiento de una técnica de detección de colonias productoras de etanol en placa.

Para facilitar la detección de las levaduras recombinantes productoras de etanol tras la primera selección con antibiótico, se pretendía realizar un pase a un medio que permitiera diferenciar las productoras de etanol de las que no lo hacían. Para ello se adaptó el método propuesto por (Grabek-Lejko et al., 2006) donde utilizaron medio YNB con xilosa como fuente de carbono (YNB-X) mezclado con una población 1×10^6 células de *S. cerevisiae*/mL de medio y posteriormente se gelificaba en cajas Petri. El principio de la técnica de detección es que *S. cerevisiae* no fermenta la xilosa presente en el medio y la levadura que se desea evaluar sí debería fermentarla, es decir produciría etanol usando xilosa. Así, *S. cerevisiae* consumiría dicho etanol producido por la levadura de interés y crecería alrededor, lo cual se verían como halos de crecimiento (Grabek-Lejko et al., 2006).

Para estandarizar la técnica se usó *Clavispora lusitaniae* productora de etanol a partir de celobiosa en diluciones 10^{-5} y 10^{-6} . Se plaquearon 100 µL de la dilución y se incubó a 30 °C durante 2 días. En la **Figura 17** puede verse el resultado del experimento, evidenciando aquellas colonias de *C. lusitaniae* que producen etanol a partir de celobiosa.

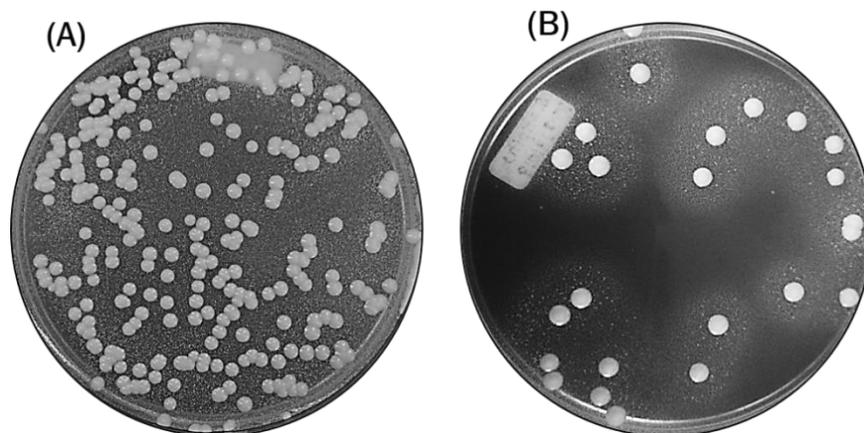


Figura 17. Formación de halos de crecimiento de *S. cerevisiae* alrededor de colonias productoras de etanol de *C. lusitaniae* en medio YNB-C incubado a 30 °C durante 2 días. Los halos de crecimiento alrededor de las colonias de *C. lusitaniae* demuestran que esta levadura tiene la capacidad de producir etanol a partir de celobiosa, debido al crecimiento de *S. cerevisiae* al consumir dicho etanol acumulado en el medio de cultivo.

7.5. Construcción *in silico* del vector de expresión para *C. lusitaniae*

A través del programa SnapGene v6.2.1 se llevó a cabo la construcción del mapa del plásmido que se planteó construir en este proyecto. El número de GenBank de las secuencias usadas se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Genes usados para la construcción del vector de expresión

Gen	GenBank
Xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i> sp	AJ249909.1
Nourseotricina N-acetil transferasa	X73149.1
Promotor de actina <i>C. lusitaniae</i> CBS 6936	LYUB02000001.1
Promotor de TDH3 <i>C. lusitaniae</i> CBS 6936	LYUB02000001.1
Terminador URA3 <i>Candida lusitaniae</i>	
Terminador CYC1 <i>C.albicans</i>	
Gen resistencia ampicilina	NC_019058.1

Se seleccionaron enzimas de restricción de corte complementario para facilitar el ensamblaje del plásmido. Las enzimas usadas para corte en dos lugares del vector

fueron: *SacI*, *BamHI* y *XhoI*. Las enzimas de corte único del vector fueron: *SpeI*, *XmaI* y *EcoRI*. El plásmido se nombró pCluXI (**Figura 18**).

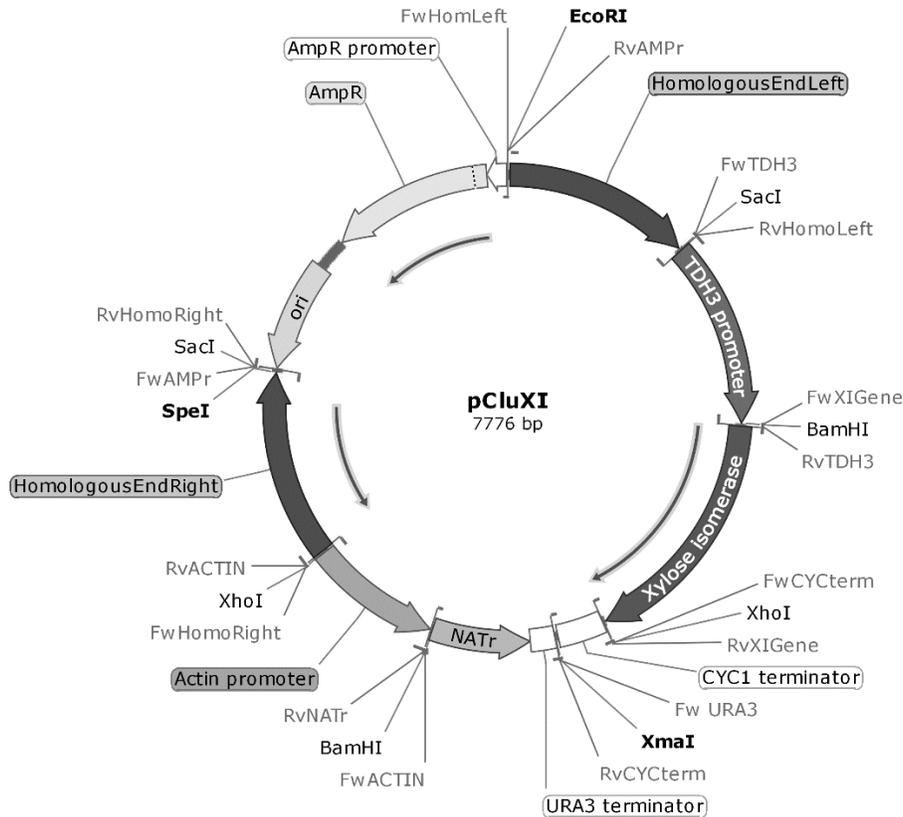


Figura 18. Mapa del vector de expresión de la xilosa isomerasa en *Clavispora lusitaniae*.

Algunos fragmentos tales como los extremos homólogos y los promotores fueron obtenidos a partir del DNA genómico de *C. lusitaniae*. Algunos otros como el gen *XYLA* de *Piromyces* sp. optimizado para *C. lusitaniae* fue mandado a sintetizar con la compañía GenScript (USA) y a partir del plásmido pV1093 (Addgene, USA) fue amplificado el cassette de resistencia para ampicilina y nourseotricina.

El plásmido pV1093 fue insertado en *E. coli* DH5 α y las colonias fueron seleccionadas después de un periodo de incubación a 37 °C durante 16 h en medio LB suplementado con ampicilina. El plásmido purificado dio una banda de ~14kb, que correspondió al tamaño esperado (**Figura 19a**). Para corroborar que el plásmido purificado fuera el correcto, se llevó a cabo una digestión con *EcoRI* durante 4 h a

37 °C, y se observó el patrón de bandeo esperado de 4 fragmentos de aproximadamente 7270, 3645, 2484 y 707 pb, respectivamente (**Figura 19c**).

El plásmido pUC57-XylA fue purificado de 5 colonias putativas de *E. coli* DH5α con un tamaño aproximado de 4 kb (**Figura 19b**). También se llevó a cabo un chequeo por restricción del plásmido pUC57-XylA digiriéndolo con las enzimas BamHI y EcoRI a 37 °C durante 4 h para la liberación del gen XylA con un tamaño esperado de 1316 pb (**Figura 19d**). De esta forma se pudo corroborar que los sitios de clonación de las enzimas BamHI y EcoRI estaban íntegros; esto era importante porque serían usados para el ensamblaje del plásmido. Adicionalmente, se llevó a cabo un chequeo por restricción con EcoRV a 37 °C por 1 h para la liberación del gen XylA con un tamaño esperado de ~1300 pb (**Figura 19e**).

Estos experimentos de restricción permitieron que se continuara con seguridad el trabajo de clonación correspondiente al ensamblaje de los fragmentos.

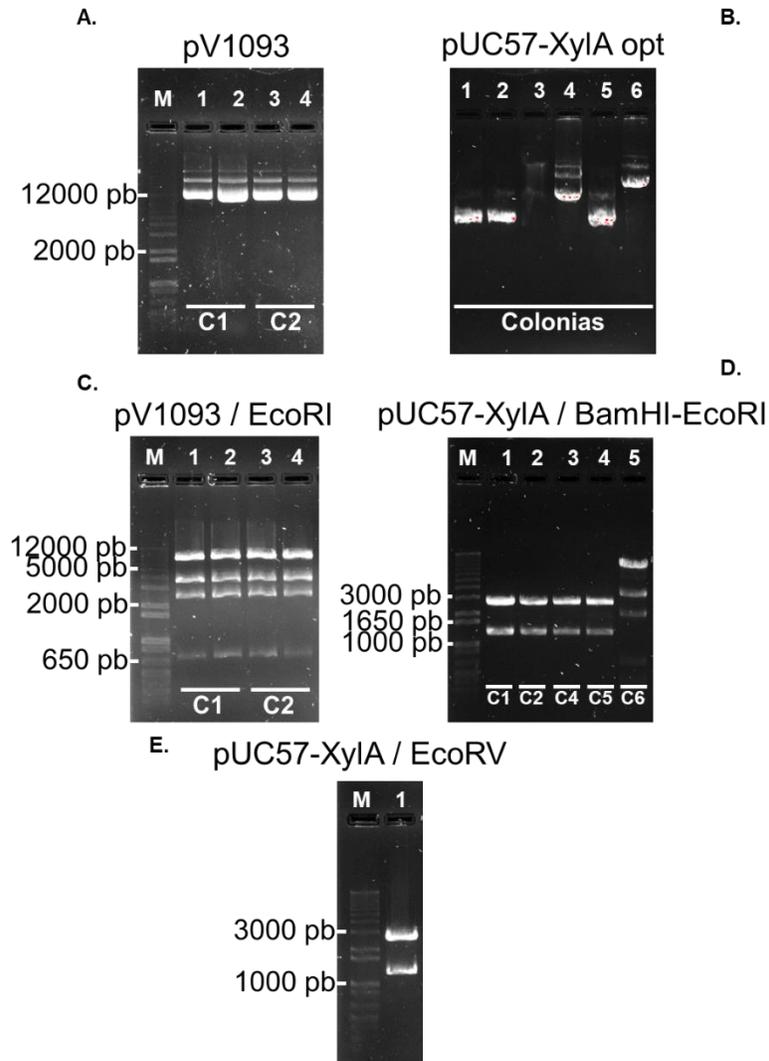


Figura 19. Electroforesis de la purificación y evaluación de los vectores pV1093 y pUC-XylA por medio de digestión enzimática. (A) Plásmido pV1093 purificado con tamaño esperado de ~14kb. (B) Plásmido pUC57-XylA purificado de 5 probables colonias positivas. (C) Chequeo por restricción del plásmido pV1093 digerido con EcoRI durante 4 h a 37 °C, con el patrón de bandeos esperado de 4 fragmentos de aproximadamente 7270, 3645, 2484 y 707 pb. (D) Chequeo por restricción del plásmido pUC57-XylA digerido con las enzimas BamHI y EcoRI a 37 °C durante 4 h para la liberación del gen XylA con un tamaño esperado de 1316 pb. (E) Chequeo por restricción del plásmido pUC57-XylA digerido con EcoRV a 37 °C por 1 h para la liberación del gen XylA con un tamaño esperado de ~1300 pb.

7.6. Diseño y estandarización de cebadores para CluXI

Para cada fragmento de interés se diseñaron 2 cebadores (directo y reverso). En cada caso, el cebador contenía la secuencia de alineamiento con el templado y un

sitio de reconocimiento para enzima de restricción. En la **Tabla 9** se muestran las secuencias y se señalan las características de cada cebador. Los cebadores fueron sintetizados por Sigma Aldrich (USA).

Tabla 9. Secuencias de los cebadores diseñados para el ensamblaje de CluXI.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
FwHomoLeft	GCATGC GAATTC GGTACCTTTTTCCGCTTCCTGTAGGGCCTATAAGCACG
RvHomoLeft	TACAAG GGAGCTC TGATTAGGCGGTCACTCCACTTATATATTTCCCTCAACGGCAAATGTGG
FwHomoRight*	CTGCTA CTCGAG TAGCAGTCTTTTTTTTTCTAGATATTCGGGGTTCAAATCAGATCCAAA
RvHomoRight	TATAAT GAGCTCCA ACTAGT TTCAAGTGTGGAGTCAAGAGAACCACAAGTCAGTTTATCA
RvAMP _r	CGGGG GAATTC AAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTAT
FwXlgene	TCAATC GGATCC TCAATCATGGCTAAGGAATATTTCCCAC
RvXlgene	ATCATC CTCGAG ATCAGCTTATTGGTACATGGCAACAATA
FwTDH3prom	TAATCAG GAGCTC CCTTGTAGGAAAGCAAGCAATCGTGCCCCAGCAAAGCACTATAGTAGGT
RvTDH3prom	GATTGAG GGATCC GATTGAGATTGATAGTTTTGTTTGTAGTTAATTGAAGTTGTAATCAAT
FwACTInprom	ACCGGAG GGATCC ACCGGAACCGGAACCGTTGTCGATAACCAATGCAGCAACTTCTTCTAG
RvACTInprom*	CTGCTA CTCGAG TAGCAGCACAAAATGACACCGATTTCTTTTTTCCGCTCTTCTGGTTTT
FwCYCterm	ATTTCT CTCGAG GTTCGAGTTCATGTAATTAGTTATGTCACG
RvCYCterm	GGGGGCC CCCGGG CCGGCCGCAAATTAAGCCTTCGAGCGT
FwURA3term	ACAACAC CCCGGG GATCTGGACCACCTTTGATTGTAAATAG
RvNAT _r	TCCGGT GGATCC TCCGGTATGAAAATTTCCGGTGATCCCTG
FwAMP _r	GTTGCT GAGCTC GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT

*Las letras en negrita corresponden al sitio de restricción.

**Las letras subrayadas corresponden al sitio de alineamiento con el molde

Posteriormente, se llevó a cabo la estandarización de las condiciones de amplificación de cada uno de los pares de cebadores usando como molde DNA genómico de *C. lusitaniae* o DNA plasmídico según fuera el caso. Se trabajaron temperaturas de alineamiento entre 50 – 70 °C con tiempos de extensión entre 30 s y 1 min. En todos los casos se lograron obtener los fragmentos esperados para cada par de cebadores. Las temperaturas definidas para cada fragmento fueron: 68 °C para HomoLeft, 64 °C para HomoRight, 60 °C para Promotor A, 61 °C para ORI+AmpR, 61 para el gen XylA, 52 °C para NatR+URA3 y, 50 °C para CYC1t. En

la **Figura 20** se muestran las amplificaciones de cada uno de los fragmentos de interés que componen el vector CluXI.

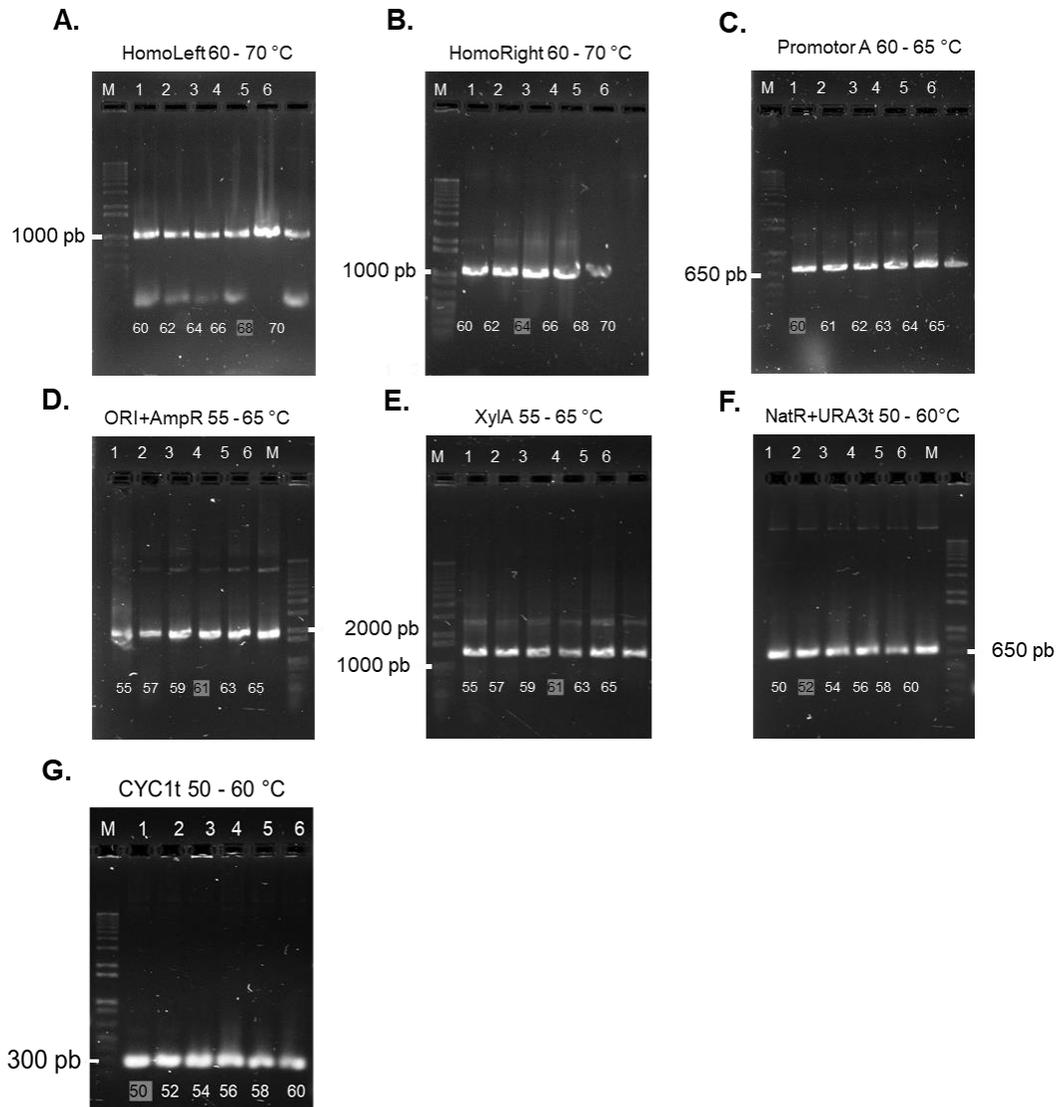


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los amplicones obtenidos por PCR de los fragmentos que componen el plásmido CluXI. El programa de PCR fue: 3 min a 95°C y 32 ciclos de 20 s de desnaturalización a 98 °C, 30 s de alineamiento al Tm óptimo y 15 s – 1:30 min de amplificación a 72 °C y por último una extensión final de 1 min a 72 °C. Los tamaños esperados para cada fragmento, la mejor temperatura de alineamiento de los cebadores y el tiempo de amplificación para cada fragmento fueron: HomoLeft (1000 pb, 68 °C, 1 min), HomoRight (1000 pb, 64 °C, 1 min), Promotor A (701 pb, 60 °C, 40 s), ORI+AmpR (1620 pb, 61 °C, 1:30 min), XylA (1314 pb, 61 °C, 1:30 min), NAT+URA3t (656 pb, 52 °C, 30 s) y CYCt (248 pb, 50 °C, 15 s).

7.7. Construcción del vector de expresión para *C. lusitaniae*

Para la construcción del vector se plantearon dos estrategias de restricción y ligación: la primera de ellas constaba de digestión y ligación de los fragmentos HomoLeft, HomoRight, Promotor A, CYC1t, XylA, ORI+AmpR, TDH3p y NatR+URA3t por PCR usando enzimas de restricción y T4 DNA ligasa, respectivamente. Se amplificaban los fragmentos de interés por medio de PCR y se continuaba con el proceso hasta obtener el plásmido ensamblado, tal como se muestra en el diagrama de flujo (**Figura 21**).

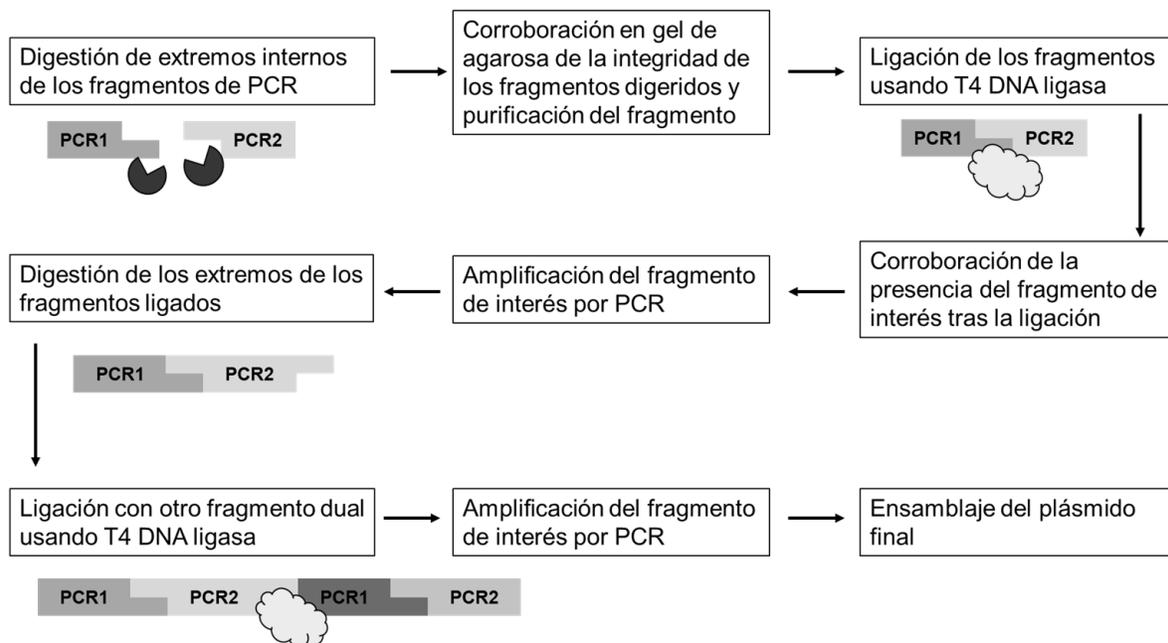


Figura 21. Estrategia de corte y ligación para la construcción el vector pCluXI.

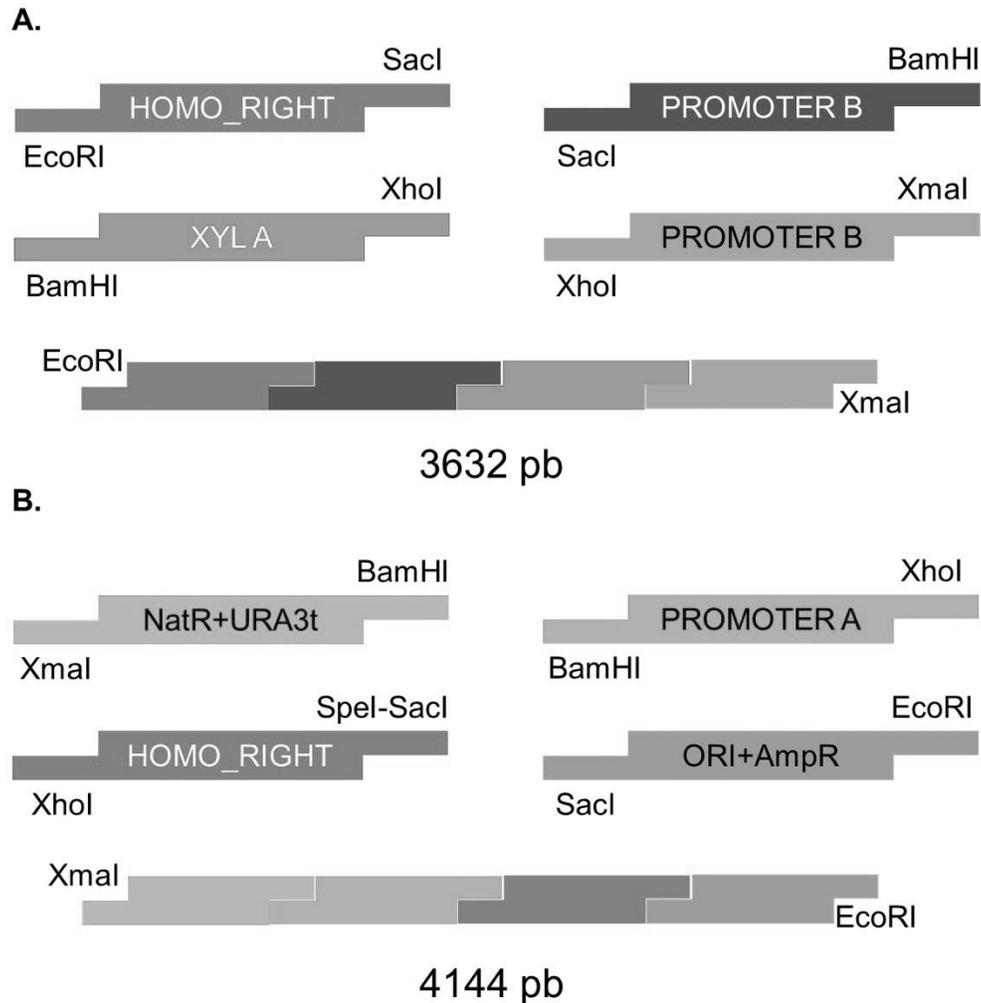


Figura 22. Estrategia de ensamblado por ligación y restricción de los fragmentos que conforman el plásmido CluXI. En cada fragmento se muestran los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción, dichos sitios fueron donados por los cebadores que fueron diseñados para amplificar cada uno de los fragmentos. Los sitios complementarios se ligaron y en la estrategia se planteó obtener dos grandes mitades, una de 3632 pb y otra de 4144 pb, que serían ligados por la complementariedad de los sitios de EcoRI y XmaI.

En cada paso de ligación se usaron dos fragmentos de PCR digeridos para un total de 4 ligaciones y 4 amplificaciones por PCR, que después se verían reducidas a 2. Posteriormente, éstas darían lugar al plásmido ensamblado final (**Figura 22**). Durante el desarrollo de esta estrategia se lograron obtener los fragmentos de interés durante las primeras ligaciones (**Figura 23**). No obstante, al intentar amplificar por PCR los fragmentos de interés para enriquecerlos antes de la segunda restricción no fue posible obtenerlos. Esto pudo ser debido al poco material

de partida que se usó como templado o la interferencia de las ligaciones inespecíficas durante la reacción de amplificación. Para intentar aumentar la eficiencia de la amplificación se trabajaron diferentes gradientes de temperatura y “touch down” PCR, esto debido a las diferencias de temperatura de alineamiento entre los cebadores (incluso mayor a los 5 °C). Pero no se lograron obtener mejores rendimientos y en algunos casos no hubo amplificación.

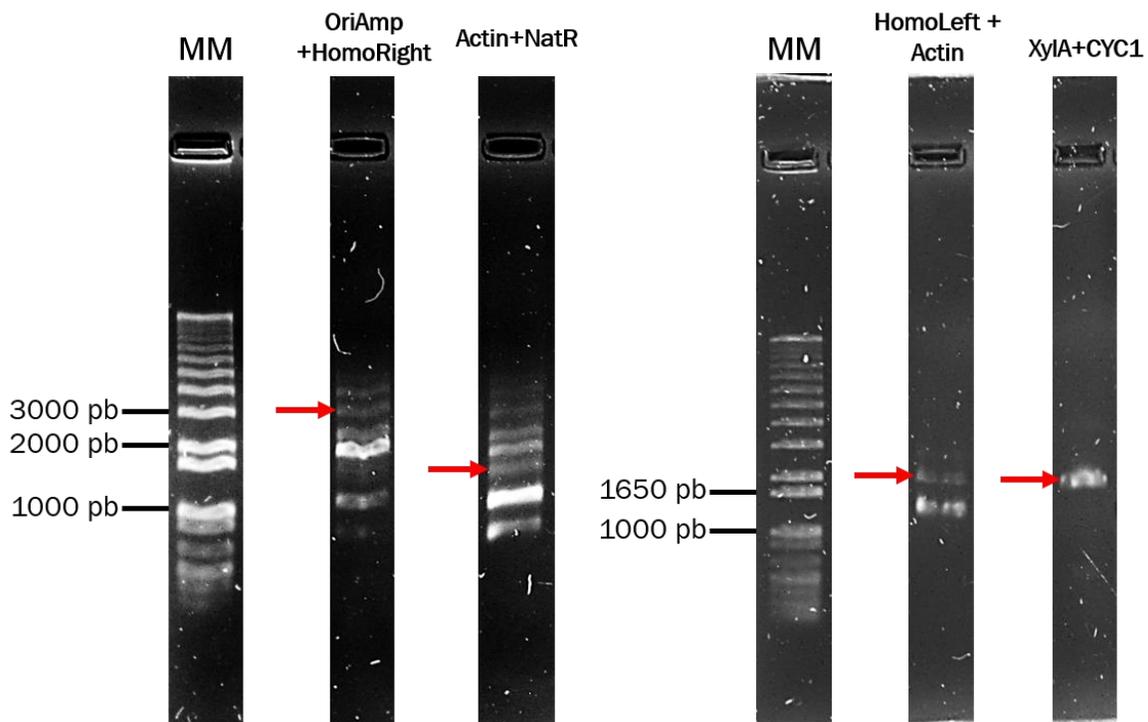


Figura 23. Ligaciones en pares de los 8 fragmentos que constituyen el vector pCluXI. Los fragmentos fueron ligados con la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific). Para la ligación se usaron 10 ng de cada fragmento, 1 U de enzima y 1 μ L de regulador en un volumen final de 10 μ L. La reacción se incubó a 4 °C durante 16 h a 4 °C.

La segunda estrategia de construcción consistió en usar plásmidos para la clonación y replicación de los fragmentos individuales sin necesidad de PCR. Se usaron los plásmidos pBluescript II KS y pDrive con longitud de 2961 pb y 3851 pb, respectivamente (**Figura 24**). Se eligieron estos plásmidos porque en su sitio de clonación múltiple (MCS) poseen los sitios de cortes duales de las enzimas de interés (EcoRI, SacI, BamHI, XhoI, SmaI, XbaI).

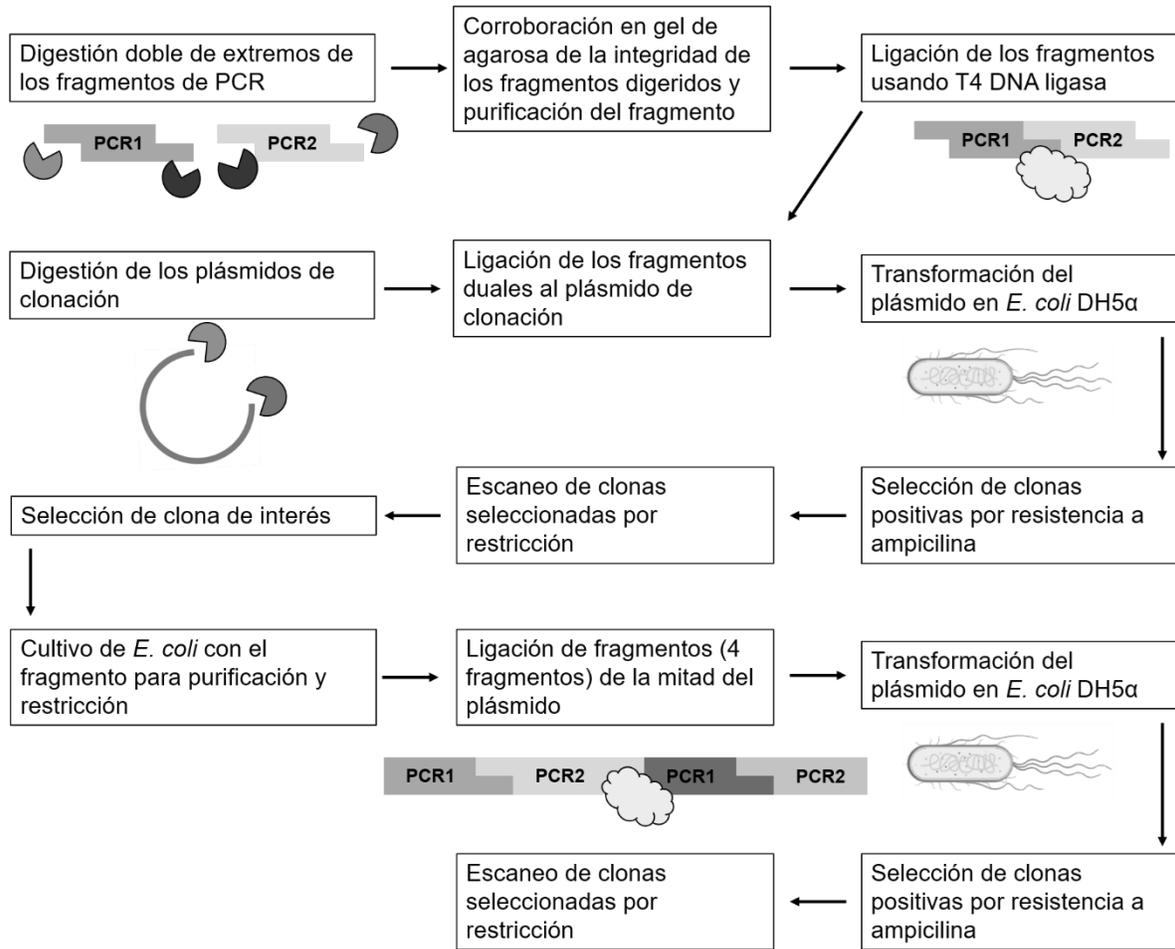


Figura 24. Esquema general de la estrategia 2 de clonación y replicación para la construcción del vector pCluXI

Tras digerir y purificar los plásmidos pDrive y pBlueScript II KS, se realizó la ligación con T4 DNA ligasa y en 3 de las 4 ligaciones se lograron apreciar los tamaños esperados para pDrive con AmpR_Ori+HomoRight, pBlueScript II KS con HomoLeft+ACTINp, y pBlueScript II KS con XylA+CYC1t para ser incorporados en los plásmidos de clonación (**Figura 25**). En la **Tabla 10** se pueden apreciar los tamaños esperados y el plásmido usado en cada uno de los fragmentos duales.

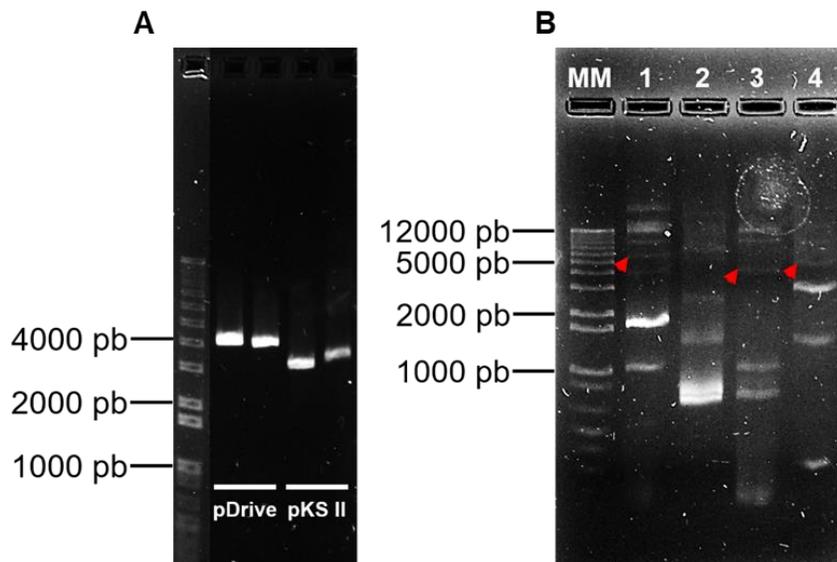


Figura 25. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos purificados pDrive y pBluescript II KS clonados en *E. coli* DH5 α (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones enzimáticas de los plásmidos ligados a AmpR_Ori+HomoRight (carril 1), ACTINp+NatR_URA3t (carril 2), HomoLeft+ACTINp (carril 3) y XylA+CYC1t (carril 4).

Tabla 10. Diseño de las construcciones parciales para replicación de los fragmentos duales del vector pCluXI.

Fragmento dual	Plásmido	Sitios de restricción	Tamaño esperado (pb)
AmpR_Ori+HomoRight	pDrive	EcoRI + SacI	6561
ACTINp+NatR_URA3t	pDrive	SacI + XmaI	5198
HomoLeft+ACTINp	pBluescript II KS	EcoRI + BamHI	4617
XylA+CYC1t	pBluescript II KS	BamHI + XmaI	4517

La eficiencia de ligación fue muy baja para lograr la transformación efectiva de *E. coli* DH5 α . Tras realizar múltiples transformaciones y revisión de clonas positivas, ninguna de las cepas contenía el fragmento de interés. El trabajo de laboratorio para la detección de las clonas implicó mayor tiempo y gasto de reactivos que la estrategia 1, debido a que se usaba la mezcla de ligación y hubo falsos positivos que interfirieron con la selección antibiótica.

Debido a la interrupción de actividades académicas presenciales por la pandemia del Covid-19 (2020), el trabajo experimental de este primer objetivo no se continuó por el tiempo y falta de recursos que implicaba para desarrollarlo. No obstante, la

información obtenida durante el desarrollo de este objetivo sirve de base para posteriores investigaciones.

El proyecto se direccionó a la línea de mejoramiento del metabolismo de xilosa en *C. lusitaniae* a través de evolución adaptativa.

Objetivo II: Obtener cepas con velocidad aumentada de consumo de xilosa y capacidad fermentativa.

7.8. Evolución adaptativa en *Clavispora lusitaniae* CDBB-L-2031

Con el objetivo de mejorar el consumo de xilosa y lograr co-consumo de glucosa y xilosa por parte de *C. lusitaniae*, se llevó a cabo un proceso de evolución adaptativa. Para lo anterior, se usó medio mínimo Breus suplementado con concentraciones crecientes de xilosa y glucosa bajo condiciones de aerobiosis a 30 °C y 150 rpm en matraces de 125 mL, respectivamente (**Apartado 5.20**). Se realizaron 13 rondas de crecimiento, lo que correspondió a aproximadamente 30 generaciones de *C. lusitaniae* calculadas en función a la biomasa inicial y la duplicación de ésta.

Durante las diferentes rondas de evolución se hizo el seguimiento del consumo de sustrato a través de la medición de azúcares reductores y el crecimiento celular. El objetivo de estas mediciones era observar una disminución en el tiempo de consumo de los azúcares presentes en el medio de cultivo a medida que aumentaban las rondas de transferencia durante el proceso de evolución (**Figura 26**).

Así mismo, se llevó a cabo la evaluación de parámetros cinéticos tales como velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (t_d) y velocidad volumétrica de consumo de sustrato (r_s). Esto con el fin de tener un primer acercamiento a los probables cambios cinéticos que presentaban las cepas evolucionadas durante el proceso de evolución (**Tabla 11**).

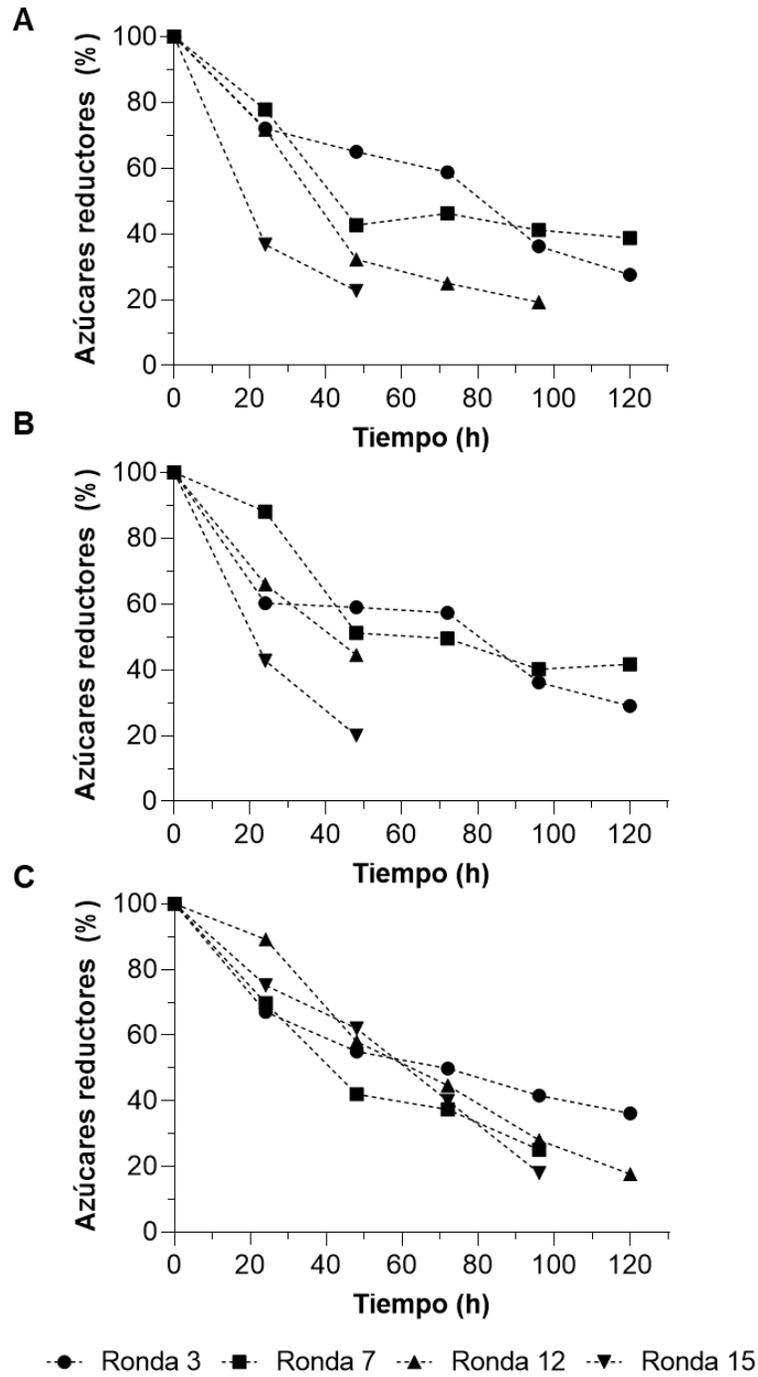


Figura 26. Consumo de sustrato por (A) Clu_Ev1, (B) Clu_Ev2 y (C) Clu_Ev3 a diferentes puntos del proceso de evolución en condiciones aerobias en medio mínimo Breus suplementado con 2% de xilosa y concentraciones crecientes de glucosa a 30 °C y 150 rpm.

Tabla 11. Cambios en la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y velocidad de consumo de sustrato de las cepas evolucionadas de *C. lusitaniae* durante el proceso de evolución.

Parámetro	Ronda	Clu_Ev1	Clu_Ev2	Clu_Ev3
μ (h ⁻¹)	1	0.010	0.011	0.009
	3	0.064	0.063	0.064
	8	0.109	0.112	0.108
	11	0.101	0.104	0.111
	15	0.111	0.112	0.111
t_d (h)	1	70.6	64.6	68.5
	3	10.8	10.9	10.9
	8	6.3	6.2	6.2
	11	6.9	6.7	6.7
	15	6.2	6.3	6.3
r_s (g/L*h)	1	0.132	0.190	0.170
	3	0.259	0.250	0.234
	8	0.210	0.271	0.322
	11	0.320	0.351	0.351
	15	0.380	0.405	0.313

Tras observar el considerable aumento en la velocidad de consumo y en la velocidad de crecimiento durante las rondas de evolución en cada una de las cepas, se decidió detener el proceso de evolución y mantener las cepas evolucionadas en medio sólido MMB suplementado con xilosa:glucosa en relación 2:1.

7.9. Cinéticas de crecimiento *C. lusitaniae* wt y cepas evolucionadas en condiciones aerobias

Con el objetivo de comparar el comportamiento de las cepas evolucionadas vs la cepa parental, se realizaron cinéticas de crecimiento en MMB suplementado con xilosa:glucosa en relación 2:1 bajo condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm durante 48 h. En la **Figura 27** se puede apreciar el consumo de sustrato y el crecimiento de cada una de las cepas evaluadas a lo largo de las 48 h de cultivo.

Se observó que durante las primeras 6 h de cultivo hubo un consumo acelerado de la fuente de carbono y éste continuó hasta las 12 h de la cinética. Después de este tiempo se observó una desaceleración hasta las 48 h. Ninguna de las cepas logró

consumir todo el sustrato disponible, pero si se observó mayor consumo por parte de las cepas evolucionadas respecto a la wt (**Figura 27a**). Adicionalmente, se observó que la cepa wt presentó mayor crecimiento durante la cinética en comparación a las evolucionadas, probablemente debido a que la fuente de carbono fue desviada mayoritariamente a crecimiento y no a acumulación de bioproductos (**Figura 27b**).

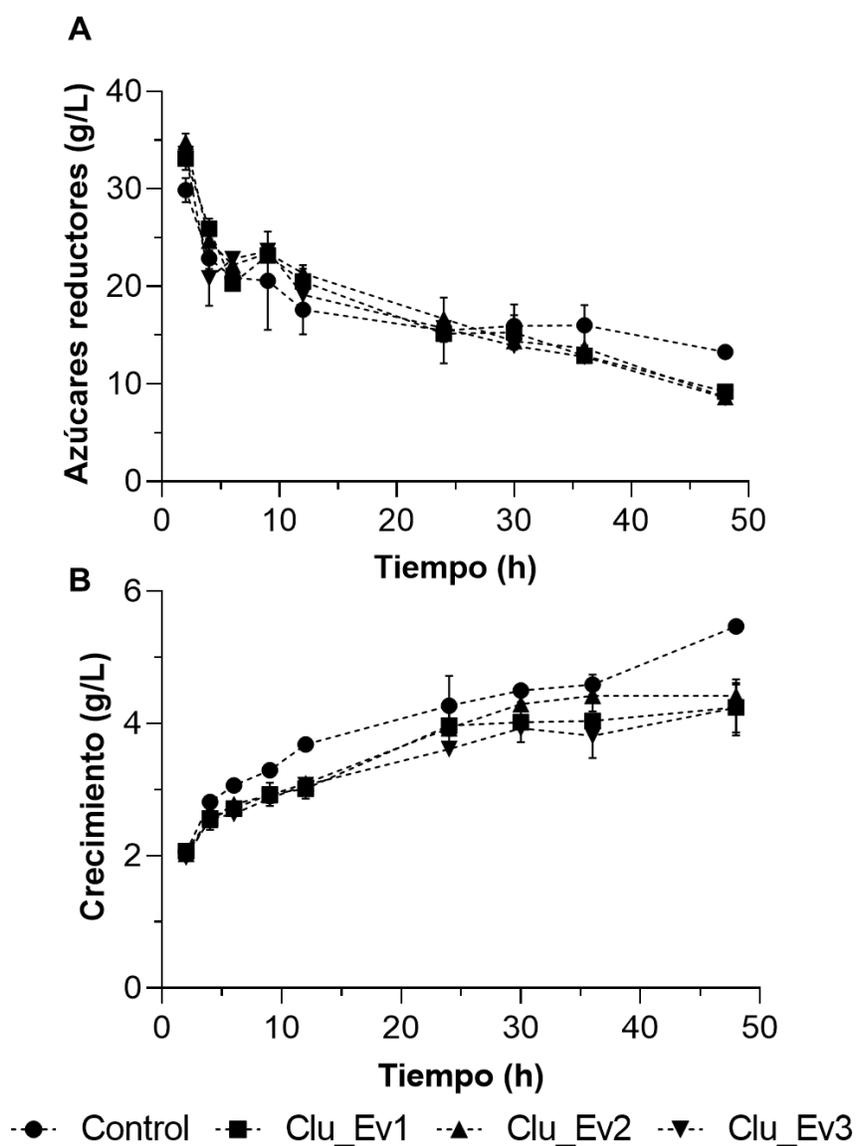


Figura 27. (A) Consumo de sustrato y (B) crecimiento de *C. lusitaniae* wt, Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3 en MMB suplementado con xilosa:glucosa en relación 2:1 en condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm.

Se decidió comparar las velocidades específicas de consumo de sustrato de cada una de las cepas en comparación a la cepa control. Mediante un ANOVA de una vía se pudo evidenciar que tras el proceso de evolución aumentó la velocidad específica de consumo (q_s) en las cepas Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3 de forma significativa en comparación a la cepa control (**Tabla 12**). Se pudo observar que la q_s de cada una de las cepas evolucionadas fue 2.5 veces superior a la observada en la cepa wt a las 48 h de proceso. Cabe señalar que también se observó una duplicación de la q_s durante las primeras 12 h de cultivo. Esto último está relacionado con lo previamente observado en la **Figura 27**, donde las cepas evolucionadas no crecieron tanto como la cepa control, pero consumieron el sustrato a una q_s mayor. Debido a que la q_s es un parámetro que tiene una relación inversamente dependiente con la biomasa ($q_s = \Delta S / \Delta \text{biomasa} \cdot h$), a menos biomasa, mayor q_s , si el consumo se mantiene igual.

Tabla 12. Velocidades específicas de consumo de sustrato (q_s^a) de *C. lusitaniae* wt y cepas evolucionadas.

Cepa	0 – 12 h	12 – 48 h	0 – 48 h
wt	0.695 ± 0.1	0.066 ± 0.0	0.099 ± 0.0
Clu_Ev1	1.357 ± 0.4	0.258 ± 0.0*	0.244 ± 0.1*
Clu_Ev2	1.270 ± 0.2	0.266 ± 0.0*	0.239 ± 0.0*
Clu_Ev3	1.325 ± 0.1	0.259 ± 0.1*	0.244 ± 0.0*

^a q_s ($g_{\text{sustrato}}/g_{\text{biomasa}} \cdot h$)

* $p \leq 0.05$.

De acuerdo con las observaciones de los comportamientos de *C. lusitaniae* wt en medio con glucosa y xilosa (**Tabla 12**), se presume que la velocidad específica de consumo que se vio aumentada fue la de la xilosa. La acumulación de mayor biomasa en la cepa wt estaría ligada a que el flujo de carbono está mayormente direccionado a la formación de biomasa; por el contrario, en las cepas evolucionadas, dicho flujo estaría redireccionado a la acumulación de xilitol.

Para confirmar dicha suposición, se midieron los sustratos y productos de la fermentación en HPLC para cada una de las cepas (**Figura 28**). Se pudo observar que para todos los casos la glucosa fue agotada a las 6 h de cultivo. Tras este

tiempo, se pudo observar una pendiente más pronunciada en el consumo de la xilosa en las cepas evolucionadas en comparación a la wt. A pesar de esto, la xilosa no se agotó durante las 48 h de cultivo (**Figura 28**). De forma global las cepas evolucionadas consumieron más xilosa en comparación a la cepa wt, éstas presentaron un Δ_{xilosa} de 15, 14.6 y 15.2 g_{xilosa}/L para Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3, respectivamente. En contraparte, la cepa wt presentó un Δ_{xilosa} de 9.2 g/L. Confirmándose de esta forma, que se aumentó en 1.6 veces la cantidad de xilosa consumida por las cepas tras el proceso de evolución adaptativa.

Acompañado de un mayor consumo de xilosa, como consecuencia, las cepas evolucionadas acumularon mayor cantidad de xilitol, llegando a niveles entre los 9.5 y 10.5 g_{XILOH}/L. Estos valores fueron 2.5 veces mayores a los obtenidos para la cepa wt, que solo acumuló 4 g_{XILOH}/L a las 48 h de proceso. Por otro lado, la acumulación de etanol fue en promedio de 5 g_{EtOH}/L en todos los casos, alcanzando el punto máximo a las 6 h de proceso, justo tras el agotamiento de la glucosa (**Figura 28**).

En la **Tabla 13** se muestran los parámetros cinéticos calculados para cada cepa durante la fermentación. Para obtener los niveles de significancia se llevó a cabo un ANOVA de una vía en los puntos máximos de acumulación de productos y de consumo de sustratos.

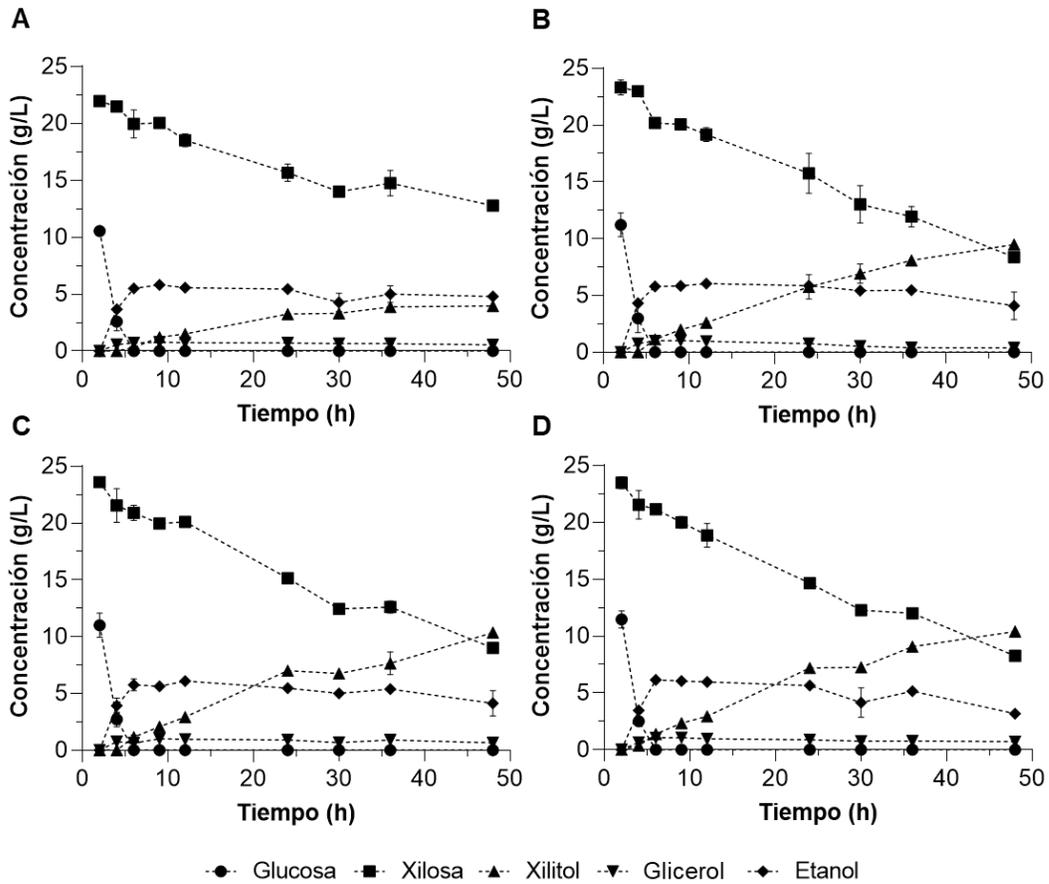


Figura 28. Consumo de sustrato y acumulación de productos por (A) *C. lusitaniae* wt, (B) Clu_Ev1, (C) Clu_Ev2 y (D) Clu_Ev3 en MMBXG con una relación 2:1 en condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm.

Tabla 13. Parámetros cinéticos de *C. lusitaniae* wt, Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3 durante la fermentación en medio MMB-XG 2:1 en condiciones aerobias.

Parámetro	wt	Clu_Ev1	Clu_Ev2	Clu_Ev3
$Y_{\text{etanol/azúcar}}^a$	0.468	0.403	0.386	0.406
$Y_{\text{xilitol/xilosa}}^b$	0.378	0.709*	0.776*	0.703*
Q_{xilosa}^c	0.200	0.325*	0.321*	0.331*
q_{xilosa}^d	0.059	0.151*	0.135*	0.148*
r_{etanol}^e	0.920	0.968	0.959	1.028
r_{xilitol}^f	0.086	0.206**	0.225**	0.226**

En todos los casos la desviación estándar fue menor al 5%.

^a $g_{\text{EtOH}}/g_{\text{glucosa}}$, ^b $g_{\text{XilOH}}/g_{\text{xilosa}}$, ^c g_{xilosa}/L^*h , ^d $g_{\text{xilosa}}/g_{\text{biomasa}}^*h$, ^e g_{EtOH}/L^*h , ^f g_{XilOH}/L^*h

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

De acuerdo con el análisis estadístico que se llevó a cabo, los parámetros que involucran el metabolismo de la xilosa ($Y_{\text{XilOH/xilosa}}$, Q_{xilosa} , r_{xilitol}) fueron los que presentaron diferencias significativas respecto a la cepa wt. Después del proceso de evolución se lograron obtener 3 cepas que presentaron un aumento promedio del 200%, 254% y 255% en el rendimiento de xilitol a partir de xilosa, en la velocidad específica de consumo de xilosa y en la productividad de xilitol, respectivamente. Estas cepas se denominaron Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3.

Los procesos de evolución adaptativa en levaduras han permitido obtener cepas que consuman con mayor velocidad fuentes de carbono de consumo lento como la xilosa. Así mismo, estos procesos han buscado lograr el co-consumo de glucosa y xilosa o al menos, disminuir la represión por parte de la glucosa sobre el consumo de la xilosa. (Diao et al., 2013) obtuvieron una cepa recombinante de *S. cerevisiae* que no consumía xilosa de forma eficiente, tras un proceso de adaptación en medio con xilosa, la cepa evolucionada presentó un incremento de 10 veces en la velocidad de crecimiento y alcanzó una q_{xilosa} de $0.957g_{\text{xilosa}}/g_{\text{biomasa}}^*h$. En otro trabajo, obtuvieron una cepa evolucionada de *S. cerevisiae* que co-consumía xilosa y glucosa. Tras el proceso de evolución lograron aumentar 2.5 veces la q_{xilosa} en presencia de glucosa y, 8.5 veces cuando ocurría consumo exclusivo de xilosa (Shen et al., 2012).

Sharma et al. (2016) obtuvieron una cepa evolucionada de *K. marxianus* que presentó una velocidad de crecimiento y una q_{xilosa} 3 y 2.81 veces mayor que la cepa parental respectivamente. La cepa evolucionada exhibió un consumo de xilosa 280 veces mayor en condiciones aerobias. Así mismo, las células presentaron una acumulación de xilitol 4.84 veces mayor que la cepa parental.

En la **Tabla 14** se muestran algunos cambios importantes en los parámetros cinéticos en levaduras sometidas a procesos de evolución para mejorar su consumo de xilosa. De esta forma, se puede observar que el exitoso proceso de evolución adaptativa en *C. lusitaniae* fue un enfoque adecuado para mejorar su comportamiento en el consumo de xilosa.

Tabla 14. Comparación de las velocidades de consumo de xilosa y rendimiento de xilitol de levaduras tras procesos de evolución adaptativa.

Levadura	Cepa	q_{xilosa}^a	$Y_{xilitol/xilosa}$	Fuente
<i>S. cerevisiae</i>	P ^b	0.02	0.05	Shen et al. (2012)
	Ev ^c	0.17	0.01	
<i>S. cerevisiae</i>	P	na	na	Diao et al. (2013)
	Ev	0.187	na	
<i>S. cerevisiae</i>	P	0.074	0.61	Peng et al. (2015)
	Ev	0.123	0.27	
<i>S. cerevisiae</i>	P	0.033	nr	Lee et al. (2014)
	Ev	0.141	nr	
<i>S. cerevisiae</i>	P	0.473	0.46	Zha et al. (2014)
	Ev	0.673	0.23	
<i>S. cerevisiae</i>	P	0.05*	nr	Vilela et al. (2015)
	Ev	0.49*	nr	
<i>K. marxianus</i>	P	0.013	0.41	Sharma et al. (2016)
	Ev	0.063	0.68	
<i>K. marxianus</i>	P	0.012	0.46	Sharma et al. (2017)
	Ev	0.061	0.54	
<i>S. cerevisiae</i>	P	0.18*	0.09	Xie et al. (2020)
	Ev	1.02*	0.15	
<i>C. lusitaniae</i>	P	0.059	0.378	Este trabajo
	Ev ₁	0.151	0.709	
	Ev ₂	0.135	0.776	
	Ev ₃	0.148	0.703	

^a q_{xilosa} (g/g_{biomasa}*h); ^bCepa parental; ^cCepa evolucionada; * r_{xilosa} (g/L*h); na: no aplica; nr: no reportado.

Es probable que el/los cambios que sufrieron las cepas obtenidas del proceso de evolución involucren un aumento en el transporte de xilosa, en las actividades enzimáticas de XR o XDH, y/o un aumento en los niveles de expresión de genes involucrados en el metabolismo de esta pentosa (Bonturi et al., 2017; Caspeta & Nielsen, 2015; Ferea et al., 1999; Payen et al., 2016).

7.10. Medición de actividades enzimáticas de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa

Con el objetivo de elucidar si el aumento en el consumo de xilosa en las cepas evolucionadas estaba asociado con un aumento en las actividades de XR y XDH,

se realizaron las mediciones de actividad enzimática en los extractos intracelulares de las cepas wt, Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3 a las 0, 8 y 24 h durante una cinética usando MMB-XG 2:1 en condiciones aerobias de acuerdo con el procedimiento mencionado en el Apartado 5.6.

La xilosa reductasa lleva a cabo la reducción de la xilosa a xilitol usando NADPH o NADH como cofactor. Previamente, en el grupo de trabajo se demostró que la XR de *C. lusitaniae* usa preferentemente el NADPH sobre el NADH (Ochoa-Chacón et al., 2022). La actividad de XR en el inóculo usando NADPH como cofactor fue significativamente diferente para las 3 cepas evolucionadas en comparación a la wt (**Figura 29a**). A las 8 y 24 h, esta actividad fue mayor respecto a la cepa wt, siendo estadísticamente significativa la actividad en la cepa Clu_Ev3 a las 24 h ($p < 0.05$). Tras el proceso de evolución, las cepas Clu_Ev2 y Clu_Ev3 presentaron una actividad de XR 1.8 veces mayor que la cepa wt en ambos casos a las 24 h de proceso (**Figura 29a**).

Por otro lado, al medir la actividad usando NADH como cofactor se observó un aumento de la actividad entre 4.9 y 8 veces mayor en comparación a la cepa wt a las 8 h de cultivo. Así mismo, se observó un aumento significativo de esta actividad en la cepa Clu_Ev3 a las 24 h, respecto a la cepa wt (**Figura 29b**), siendo significativamente diferente ($p < 0.001$) a las 24 h, lo cual representa un aumento de 98 veces respecto a la cepa wt. Este aumento en la actividad de XR en las tres cepas podría ser uno de los motivos por los cuales es metabolizada mayor cantidad de xilosa a xilitol.

La xilitol deshidrogenasa lleva a cabo la oxidación del xilitol a xilulosa usando NAD^+ como cofactor. Las cepas evolucionadas presentaron una actividad entre 2 a 25 veces mayor que la cepa wt desde las 0 h (**Figura 29c**). A las 8 y 24 h la actividad de la XDH se mantuvo más alta en las cepas evolucionadas respecto a la cepa wt. Tras 24 h de cultivo, la actividad fue 1.8, 3.7 y 4.1 veces mayor en las cepas Ev1, Ev2 y Ev3 en comparación a la cepa wt, respectivamente.

Diferentes autores que han reportado un aumento en el consumo de xilosa tras los procesos de evolución adaptativa también han reportado aumentos en las actividades de XR y XDH. Peng et al. (2012) sometieron a un proceso de evolución adaptativa a una cepa recombinante de *S. cerevisiae*, dicha cepa presentó un aumento en la actividad de XDH 0.72 veces mayor que la cepa control. Por otro lado, Zha et al. (2014) obtuvieron una cepa recombinante de *S. cerevisiae* con metabolismo mejorado para la xilosa. Después de la evolución, la actividad de XR alcanzó niveles 4 y 21 veces mayor en comparación a la cepa control, usando NADH y NADPH, respectivamente. Similarmente, Xie et al. (2020), obtuvieron una cepa mejorada de *S. cerevisiae* a través de múltiples herramientas de ingeniería genética. Fue a través de evolución adaptativa que lograron obtener una cepa con una actividad de XR 1.22 veces mayor en comparación a la cepa parental; así mismo, la cepa evolucionada presentó una actividad de XDH 1.5 mayor en comparación a la parental.

A pesar del aumento en las actividades de XR y XDH en las cepas evolucionadas de *C. lusitaniae*, dichas velocidades son inferiores a las observadas en otras cepas sometidas a procesos de evolución. La actividad más alta de XR usando NADH y NADPH observada para Clu_Ev3 fue 98 mU/mL y 15.71 mU/mL, respectivamente. Por otro lado, la actividad más alta de XDH fue 9.45 mU/mL, también exhibida por la cepa Ev3. Estos valores están un orden de magnitud en promedio, por debajo de las mostradas por *S. cerevisiae* modificada cuyas actividades están en el intervalo de 0.1 – 1.7 U/mL (Peng et al., 2012; Xie et al., 2020; Zha et al., 2014). En comparación a levaduras del tipo no-*Saccharomyces*, las cepas evolucionadas de *C. lusitaniae* también presentaron actividades de XR y XDH menores, lo que explicaría el por qué aún no puede producir etanol a partir de xilosa (**Tabla 15**).

Tabla 15. Levaduras y actividades enzimáticas de XR y XDH en diferentes condiciones de aireación.

Levadura	Aireación	Actividad específica (U/mg)			
		XR		XDH	
		NADPH	NADH	NAD ⁺	NADP ⁺
<i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y-7124	CLO	NR	6.59	5.44	NR
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	Anaerobiosis	0.27	0.62	0.78	NR
<i>Candida shehatae</i> C81015	CLO	1.70	3.25	2.60	NR
<i>Candida tenuis</i> NRRL Y-1498	CLO	0.27	NR	0.28	NR
<i>Spathaspora arborariae</i> NRRL Y-48658	CLO	1.86	0.77	0.12	NR
<i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y-27907	CLO	0.46	0.60	0.21	NR
<i>Kluyveromyces marxianus</i> YZJ088	CLO	0.35	0.10	0.30	0.45
<i>Schefferomyces stipitis</i> ATCC 58376	Anaerobiosis	0.73	0.65	0.31	NR
<i>Spathaspora passalidarum</i> ATCC MYA 4345	Anaerobiosis	0.24	0.86	0.44	NR
Clu_Ev3 (este trabajo)	CLO	0.016	0.098	0.001	-

(Tomada, traducida y modificada de Ochoa-Chacón et al., 2021)

*CLO: condiciones limitadas de oxígeno

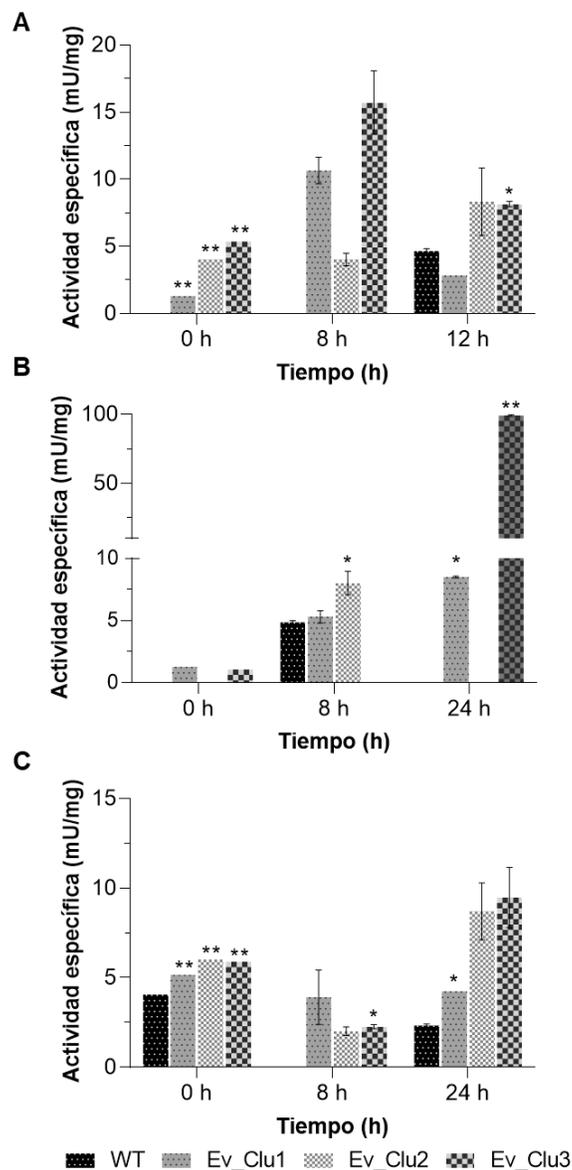


Figura 29. Actividad específica de la xilosa reductasa usando (A) NADPH y (B) NADH como cofactor, y de la xilitol deshidrogenasa (C) en *C. lusitanae* wt y en las cepas evolucionadas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Dado que los cambios que presentaron las cepas evolucionadas respecto a la cepa control fue en aumento de producción de xilitol y en ningún caso se pudo asociar el aumento de consumo de xilosa con algún cambio en la producción de etanol, se presume que el aumento en la actividad de XR es el responsable del aumento de la acumulación de xilitol.

Por otro lado, cabe resaltar que si bien la cepa Clu_Ev3 presentó un aumento en la actividad de XR usando NADH como cofactor no se observó una producción mayor de etanol. Esto podría apuntar a que la solución del desbalance de cofactor puede no ser lo único que se requiera para que *C. lusitaniae* produzca etanol a partir de xilosa. Podría existir una limitante en la ruta de las pentosas fosfato (PPP) o en el flujo glucolítico. Previamente se ha reportado que un mayor flujo en la PPP y en la glucólisis aumentan la producción de etanol (Veras et al., 2019). Así mismo, en cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que producen etanol a partir de xilosa, se ha demostrado que una baja actividad en la parte oxidativa de la PPP no permite la regeneración de NADPH. Por otro lado, la xilosa no activa la respuesta fermentativa en la levadura, por lo cual se genera un cuello de botella en la parte baja de la glucólisis, lo que conllevaría a una reoxidación ineficiente del NADH (Feng & Zhao, 2013; Wasylenko & Stephanopoulos, 2015).

La evolución adaptativa ha sido reportada como una herramienta eficiente para aumentar el metabolismo de la xilosa aumentando el flujo de carbono, resultando en rendimientos mayores, de etanol y/o xilitol, acompañados de velocidades de consumo y actividades enzimáticas mayores (Sharma et al., 2016; Xie et al., 2020). En el presente trabajo se lograron aumentar las actividades de XR y XDH probablemente y con ello se aumentó de la cantidad de xilosa consumida y la cantidad de xilitol producido. Si bien aún no se conoce cuál es el problema o los problemas que limitan a *C. lusitaniae* en la producción de etanol a partir de xilosa. Los resultados obtenidos abren el panorama a evaluar otros puntos en el metabolismo de la xilosa que pueden ser de importancia. Por ello, se decidió realizar la medición de los niveles de expresión de algunos genes involucrados en el metabolismo de la xilosa.

7.11. Evaluación de Clu_Ev3 bajo diferentes condiciones de sustrato

La cepa Clu_Ev3 fue seleccionada como la mejor de las tres evolucionadas debido a que presentó las actividades enzimáticas más altas respecto a las otras cepas y fue una de las que acumuló más xilitol. Para comprender los cambios que presentó esta cepa, se decidió evaluarla bajo diferentes concentraciones de xilosa pura y en mezclas de glucosa y xilosa.

7.11.1. Cinética de Clu_Ev3 en MMB suplementado con 1.5 y 2% de xilosa

Debido a que el proceso de evolución se llevó a cabo en medio con xilosa y glucosa, se llevó a cabo una cinética en condiciones microaerobias con xilosa como única fuente de carbono al 1.5 y 2% para observar las velocidades de consumo y la producción de xilitol de la cepa Clu_Ev3 (**Figura 30**).

Cuando se usó 1.5% de xilosa como fuente de carbono, Clu_Ev3 consumió el 87% de la xilosa disponible en el medio con una q_{xilosa} de $0.159 \text{ g}_{xilosa}/\text{g}_{biomasa} \cdot \text{h}$ durante las primeras 24 h de proceso. La q_{xilosa} global fue de $0.088 \text{ g}_{xilosa}/\text{g}_{biomasa} \cdot \text{h}$, reduciéndose casi a la mitad. Así mismo, el rendimiento de xilitol fue superior en las primeras 24 h de la cinética, alcanzando $0.299 \text{ g}_{xilitol}/\text{g}_{xilosa}$. Bajo estas condiciones, la velocidad específica de consumo de xilosa estuvo dentro de los valores observados en las cinéticas con xilosa y glucosa (**Tabla 16**). No obstante, el rendimiento y la productividad de xilitol fueron 2.3 veces menores cuando se usó 1.5% de xilosa en lugar de XG 2:1. Bajo estas condiciones no fue detectado etanol (**Figura 30a**).

Por otro lado, cuando se usó 2% de xilosa, Clu_Ev3 consumió el 82% de la xilosa presente en el medio, con una q_{xilosa} de $0.171 \text{ g}_{xilosa}/\text{g}_{biomasa} \cdot \text{h}$ dentro de las primeras 24 h de consumo, y una q_{xilosa} global de $0.112 \text{ g}_{xilosa}/\text{g}_{biomasa} \cdot \text{h}$ hasta las 48 h. La máxima q_{xilosa} observada fue 15% superior a la observada en esta misma cepa creciendo en MMB-XG 2:1 (**Tabla 16**). Por otro lado, el rendimiento de xilitol durante

las primeras 24 h de la cinética fue $0.728 \text{ g}_{\text{xilOH}}/\text{g}_{\text{xilosa}}$, coincidiendo con la mayor velocidad de consumo de xilosa, siendo 2.5 veces superior que cuando creció en 1.5% de xilosa. La productividad de xilitol durante la cinética fue $0.131 \text{ g}_{\text{xilitol}}/\text{L}\cdot\text{h}$. en este caso, la productividad fue 58% inferior a la observada en la mezcla XG 2:1 (**Tabla 15**). Durante el transcurso de esta cinética no fue detectado etanol (**Figura 30b**).

Se ha demostrado que cuando cepas de levaduras evolucionadas son sometidas a ambientes diferentes a los de sus procesos de evolución adaptativa, presentan un perfil transcriptómico distinto. Esto implica que, el fenotipo obtenido después del proceso de ingeniería adaptativa tiene una estrecha relación con las condiciones ambientales. De esta forma, las condiciones del proceso de adaptación se vuelven determinantes para que se mantenga el comportamiento y la supervivencia de la levadura (Gorter et al., 2017; Yang & Tavazoie, 2020).

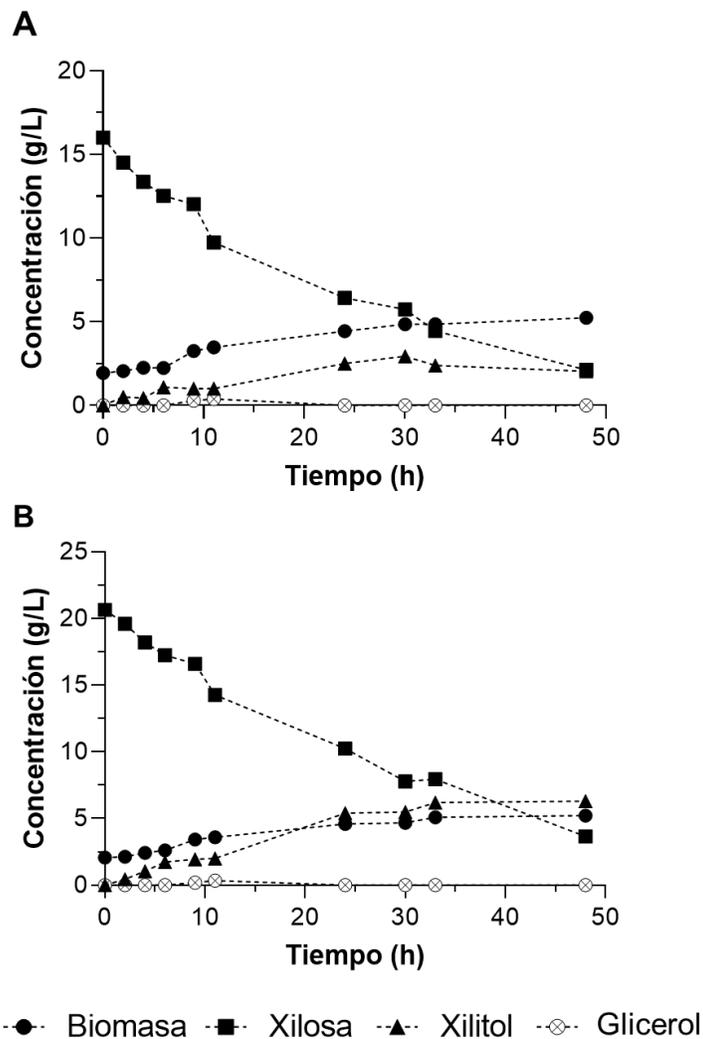


Figura 30. Consumo de sustrato, crecimiento y producción de xilitol por *Clu_Ev3* en MMB con (A) 1.5% y (B) 2% de xilosa en condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm.

Tabla 16. Parámetros cinéticos de la cepa *Clu_Ev3* en diferentes sustratos en condiciones aerobias.

Parámetro	XG 2:1	XG 1.5:1	XG 1:1	X 1.5%	X 2%
$Y_{EtOH/azúcar}^a$	0.406	0.378	0.360	nd	nd
$Y_{XilOH/xilosa}^b$	0.703	0.423	0.165	0.299	0.728
q_{xilosa}^c	0.148	0.145	0.103	0.159	0.171
$r_{xilitol}^d$	0.226	0.081	0.044	0.098	0.131
r_{etanol}^e	1.028	1.212	1.246	-	-
% xilosa residual	35.16	22.14	16.74	13.23	17.73

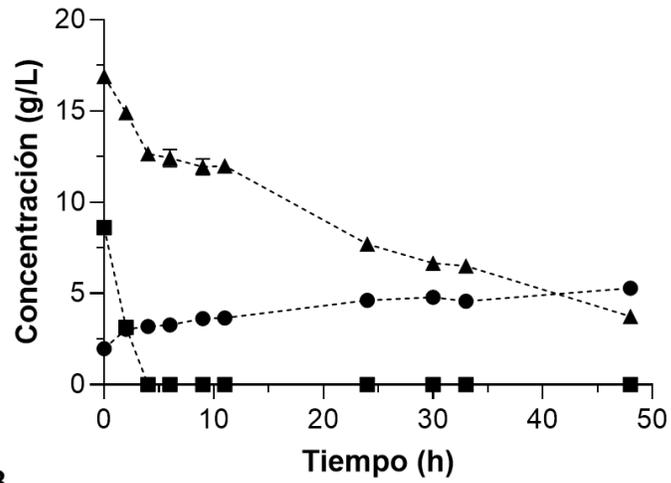
^ag_{EtOH}/g_{glucosa}; ^bg_{XilOH}/g_{xilosa}; ^cg_{xilosa}/g_{biomasa}*h; ^dg_{XilOH}/L*h; ^eg_{EtOH}/L*h

7.11.2. Cinética de Clu_Ev3 en MMB suplementado con mezcla 1.5:1 y 1:1 de xilosa:glucosa

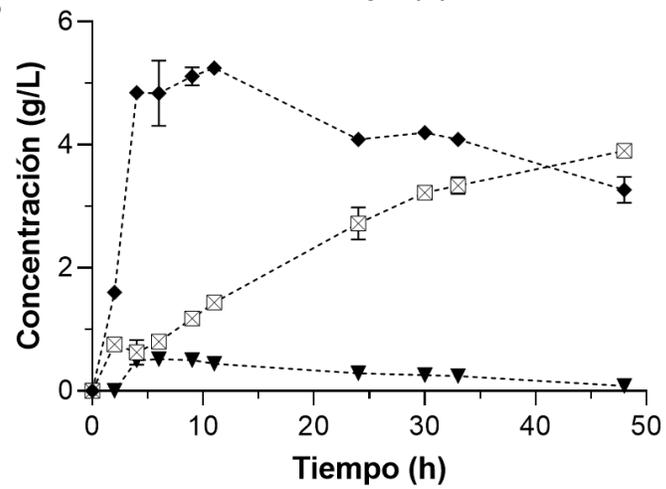
Con el fin de elucidar si el comportamiento de la cepa Clu_Ev3 se mantenía igual en proporciones diferentes de xilosa:glucosa a las usadas durante el proceso de evolución, se llevaron a cabo cinéticas en condiciones microaerobias en MMB con relaciones de xilosa:glucosa de 1.5:1 y 1:1 (**Figura 31, 32**). Se redujeron las concentraciones de xilosa con el fin de lograr un consumo total de los azúcares disponibles, ya que en las cinéticas con relación 2:1, aún quedaban 8 g/L de xilosa en el medio de cultivo.

En la **Figura 31** se muestran los perfiles de consumo de azúcares y producción de biomasa y metabolitos cuando Clu_Ev3 creció en MMB-XG 1.5:1. Bajo las condiciones estudiadas Clu_Ev3 consumió el 78% de la xilosa, dejando como residual 3.7 g/L de xilosa en el medio de cultivo. Las concentraciones máximas de etanol y xilitol fueron 5.2 y 3.9 g/L, respectivamente. La levadura presentó un rendimiento de etanol de 0.378 g_{EtOH}/g_{azúcar}, un valor 7% menor al observado en la mezcla 2:1 xilosa:glucosa. Cuando Clu_Ev3 creció en MMB-XG 1:1, consumió el 83.3% de la xilosa, dejando como residual 1.7 g/L de xilosa en el medio de cultivo. Las concentraciones máximas de etanol y xilitol fueron 5.0 y 1.17 g/L, respectivamente (**Figura 32**). El etanol producido estuvo dentro de los mismos valores previamente descritos, debido a que la cantidad de glucosa en el medio no cambió. En el caso del xilitol, su acumulación fue menor debido a la menor disponibilidad de xilosa en el medio de cultivo (**Tabla 16**).

A



B



● Biomasa ■ Glucosa ▲ Xilosa ◆ Etanol □ Xilitol ▼ Glicerol

Figura 31. (A) Consumo de sustrato y crecimiento y (B) acumulación de productos por Clu_Ev3 en MMB con relación 1.5:1 de xilosa:glucosa en condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm.

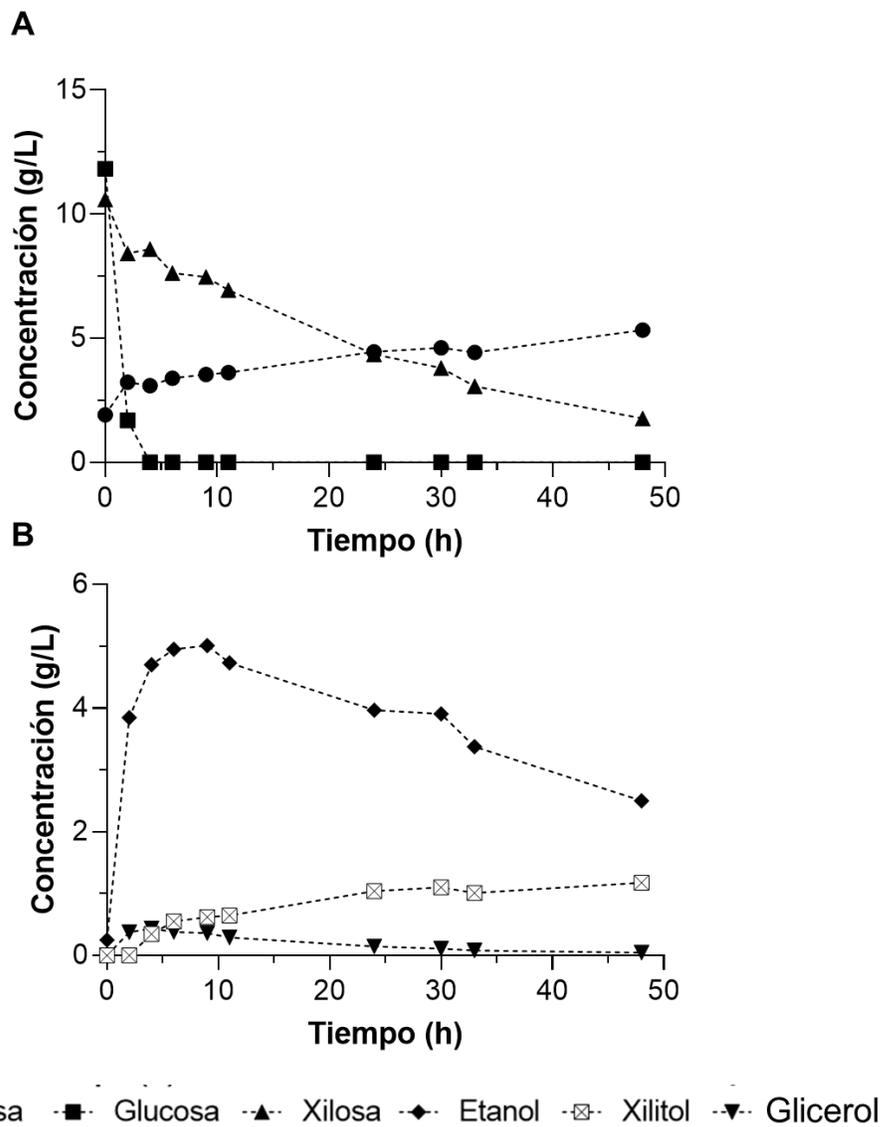


Figura 32. (A) Consumo de sustrato y crecimiento y (B) acumulación de productos por Clu_Ev3 en MMB con relación 1:1 de xilosa y glucosa en condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm.

Objetivo III: Medir los niveles de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de la xilosa en cepas evolucionadas.

7.12. Estandarización de las condiciones de amplificación de los cebadores

En el apartado 5.18 de materiales y métodos se mencionan los pares de cebadores que fueron diseñados para evaluar la expresión de algunos genes del metabolismo de la xilosa. Se eligieron genes involucrados en el transporte de la xilosa (*HXT1*, *GXS1* y *XYLT*), en el metabolismo río arriba de la xilosa (*XYL1*, *XYL2* y *XKS1*) y en la fermentación alcohólica (*PDC1* y *ADH1*).

Con el fin determinar las temperaturas de alineamiento adecuadas para cada par de cebadores se llevó a cabo la estandarización de las temperaturas de alineamiento por medio de PCR de gradiente en un intervalo de 50 – 60 °C, con tiempos de alineamiento y extensión de 30 s. Para el caso de los genes *XYL1* y *XYL2*, se estandarizó previamente su temperatura de alineamiento a 58 °C (Santiago Benítez, 2017).

En la **Figura 33** se observa que en todas las temperaturas del gradiente de 50 – 60 °C hubo amplificación, y los productos obtenidos presentan un tamaño que corresponde al esperado durante el diseño de los cebadores **Tabla 4**. De esta forma también se logró confirmar que *C. lusitaniae* posee homólogos de los genes *GXS1* de *C. intermedia* y el putativo *XYLT* de *C. parapsilosis*.

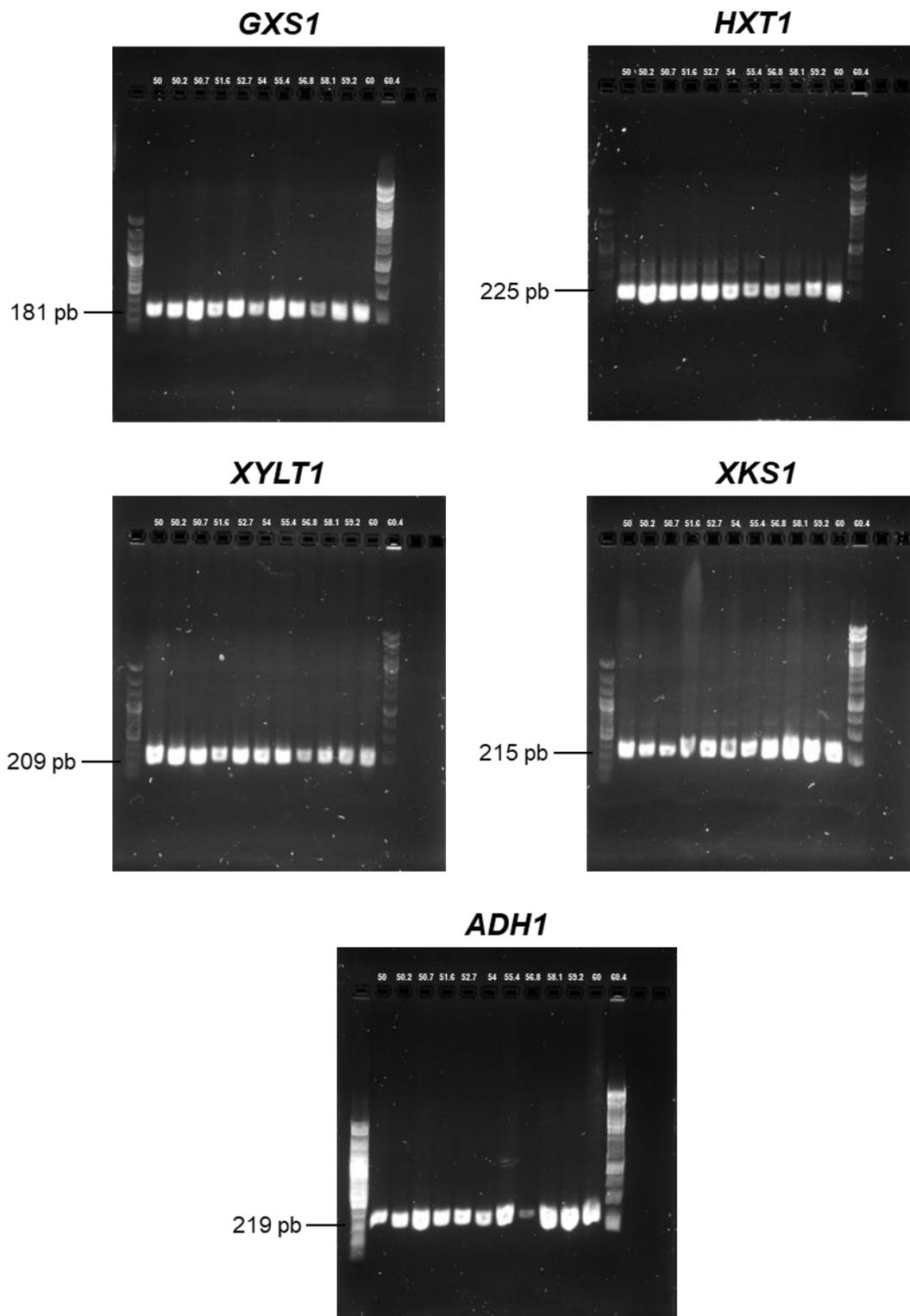


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la PCR en gradiente de temperatura para los genes *GXS1*, *HXT1*, *XYLT*, *XKS1* y *ADH1*.

7.13. Medición de los niveles de expresión de *XYL1*, *XYL2*, *XYL3*, *GXS1*, *HXT1* y *XYLT* en cinéticas de crecimiento de *C. lusitaniae* wt y cepas evolucionadas en condiciones aerobias

Previamente se realizaron cinéticas con la cepa de *C. lusitaniae* wt y las cepas evolucionadas en medio mínimo Breus con relación 2:1 de xilosa y glucosa en condiciones aerobias. Parte del paquete celular fue almacenado a -80 °C hasta que se llevaran a cabo las extracciones de RNA.

Las extracciones se hicieron con el método de extracción de fenol:cloroformo, usando como agentes de lisado SDS al 10 %, perlas de vidrio y vibración. La precipitación de RNA se logró usando cloruro de litio a 4 °C durante 12 h. Posteriormente, se llevó a cabo la cuantificación de RNA en espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Finalmente, se llevó a cabo una electroforesis en gel desnaturalizante para corroborar la integridad del RNA (**Figura 34**).

Una vez que se corroboró la concentración e integridad del RNA, se llevó a cabo la síntesis de cDNA con el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, USA) usando como templado 2 µg de RNA tratado con DNAsa. Para corroborar que la síntesis de cDNA fue exitosa, se llevó a cabo el chequeo por medio de PCR usando los cebadores de actina (*ACT1*) (**Figura 35**).

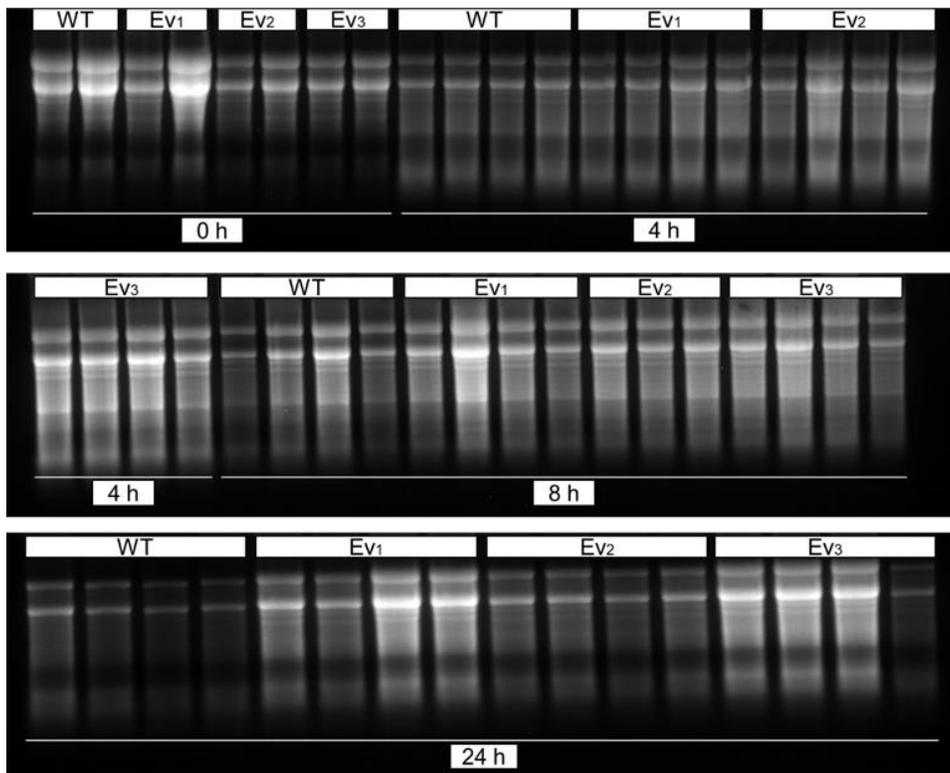


Figura 34. Integridad del RNA total tratado con DNasa I tras su extracción. La electroforesis en gel de agarosa al 1% se corrió en regulador MOPS usando formamida y formaldehído como agentes desnaturalizantes del RNA.

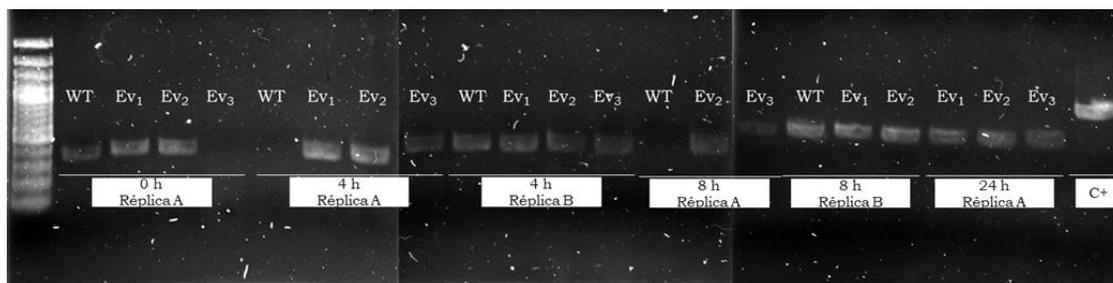


Figura 35. Síntesis de cDNA por medio de PCR punto final usando los cebadores del gen *ACT1* y *GAPDH* (control positivo).

Una vez lograda la síntesis de cDNA, se llevaron a cabo experimentos de PCR cuantitativa para observar si había cambios en la expresión de los genes que se eligieron previamente. Se seleccionó la cepa Clu_Ev3 para comparar con la cepa control porque esta cepa es la que presentó las características más importantes

para este trabajo como q_{xilosa} , $Y_{XilOH/Xil}$, Q_{XilOH} y actividades de XR y XDH mayores respecto a las presentadas por la cepa wt.

Los puntos que se eligieron para medir los posibles cambios en los niveles de expresión fueron los tiempos: 0 h (inicio de la fermentación/inóculo), 4 h (consumo de glucosa), 8 h (cambio de consumo de glucosa a xilosa) y 24 h (consumo de xilosa).

Los controles endógenos que se propusieron fueron los genes *ACT1* y *ADH1*. Para decidir cuál control usar se llevó a cabo un experimento preliminar con cada par de cebadores usando como templado el cDNA de los tiempos 0, 4, 8 y 24 h. Se determinaron las Ct en cada caso y se eligió *ADH1* como control endógeno, debido a que su amplificación ocurría más temprano y presentaba mayor estabilidad en su curva de amplificación (**Tabla 17**).

La importancia de la elección de un control endógeno adecuado radica en que la curva de amplificación y por ende su Ct, no debe variar, independientemente del estado fisiológico y biológico del organismo que está siendo evaluado. Normalmente, los genes “housekeeping” son fundamentales para la supervivencia del organismo, y es por ello que su expresión es estable y constante (Borkowska et al., 2020). En levaduras *ACT1* y *GAPDH* han sido usados como controles endógenos por diferentes grupos de trabajo (Jing et al., 2018; Li et al., 2012; Nadai et al., 2015). Pero en algunas levaduras como *Candida glabrata* y *Yarrowia lipolytica* no han sido los adecuados, debido a cambios en su expresión durante tratamiento con antifúngicos o en procesos fermentativos (Borkowska et al., 2020; Li et al., 2012). Dentro de nuestro conocimiento, ésta es la primera vez que se reporta *ADH1* como control endógeno en una levadura.

Tabla 17. Evaluación de *ACT1* y *ADH1* como candidatos a controles endógenos para los análisis de niveles de expresión.

Gen	Tiempo (h)	Ct	Promedio
<i>ACT1</i>	0	17.61	19.19 ± 1.43
	4	19.58	
	8	18.62	
	24	20.98	
<i>ADH1</i>	0	14.95	14.74 ± 0.28
	4	14.43	
	8	15.01	
	24	14.58	

Una vez se eligió el control endógeno, se llevaron a cabo los experimentos. Para cada par de cebadores se analizaron los siguientes puntos (**Figura 36**):

- Dos controles sin templado (NTC)
- Dos réplicas técnicas del tiempo 0, 4, 8 y 24 h
- Dos duplicados biológicos (A y B) de los tiempos 4, 8 y 24 h

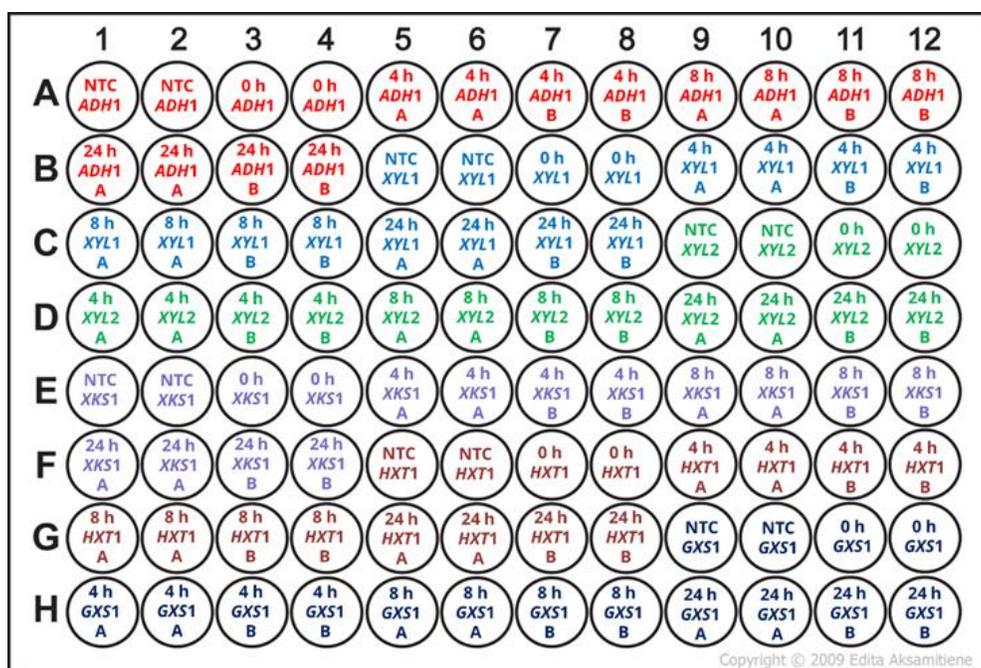


Figura 36. Diseño de los experimentos de qPCR para medición de expresión de *XYL1*, *XYL2*, *XKS1*, *HXT1* y *GXS1* de *C. lusitaniae* wt y Ev3.

En la **Figura 37** se observa que los genes *XYL1* y *XYL2* mostraron disminución en sus niveles de expresión a las 4 h. Lo que indica que la glucosa ejerce un efecto represor sobre la expresión de estos dos genes. Por otro lado, a las 8 h, inicia el consumo acelerado de la xilosa tras el agotamiento de la glucosa, *XYL1* se expresa en niveles superiores respecto a las 0 y 4 h. Esto indica que la xilosa promueve la expresión de *XYL1* (**Figura 38**).

Para los genes *XYL2* y *XKS1* se observó un patrón de expresión similar, ambos disminuyeron su expresión a las 4 y 8 h y aumentó a las 24 h. Esto implicaría que el efecto de represión no tendría que ver en total medida por la presencia de glucosa, sino también con la ausencia del sustrato inductor; xilitol en el caso de *XYL2* y, xilulosa en el caso de *XKS1*. Cabe resaltar que, durante el desarrollo de las cinéticas, el xilitol se acumuló mayormente a partir de las 24 h en las cepas evolucionadas. Por otro lado, el gen *XKS1* aumentó sus niveles de expresión hasta las 48 h de cultivo. Esto implica que dicho gen es regulado negativamente por la presencia de glucosa o exista un retraso en su expresión por la baja concentración de sustrato inductor (xilulosa). Esto último, podría estar relacionado con la baja actividad enzimática de XDH observada previamente (**Figura 29**), ya que una baja actividad implica una producción más lenta de xilitol y con ello una baja inducción de la expresión de *XKS1*. Lo anterior sugiere que la xilosa puede estar compitiendo con la glucosa por los transportadores, ya que en algunas levaduras no existen transportadores específicos para esta pentosa, y utiliza los existentes para la glucosa; esta competencia puede reducir su consumo (Farwick et al., 2014). La mayoría de los transportadores de xilosa identificados en algunas levaduras son inhibidos competitivamente por la glucosa, lo que constituye uno de los principales problemas que dificultan el consumo simultáneo de glucosa y xilosa. La inhibición del transporte de xilosa podría disminuir la acumulación intracelular de xilosa y, en consecuencia, una baja inducción de genes asociados a su metabolismo, creando un cuello de botella para el metabolismo río abajo (Ribeiro et al., 2021). Subtil & Boles (2012) demostraron que en *S. cerevisiae*, la glucosa impide la utilización simultánea de pentosas debido a la inhibición de sus transportadores por esta

hexosa. La sobreexpresión de transportadores de pentosas puede resolver parcialmente los problemas asociados a la co-fermentación.

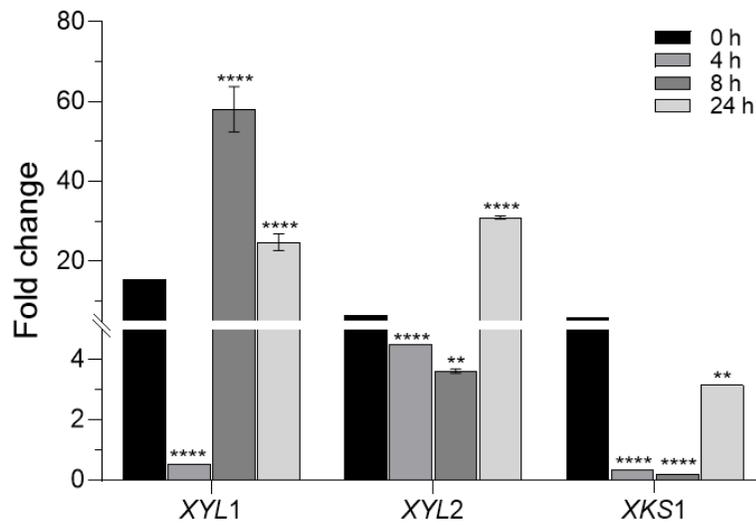


Figura 37. Niveles de expresión de los genes *XYL1*, *XYL2* y *XKS1* en *C. lusitaniae* Ev₃ respecto a la cepa wt crecidas en MMB suplementado con 2% xilosa y 1% glucosa. Control endógeno: *ADH1*. (****p<0.0001, **p<0.005).

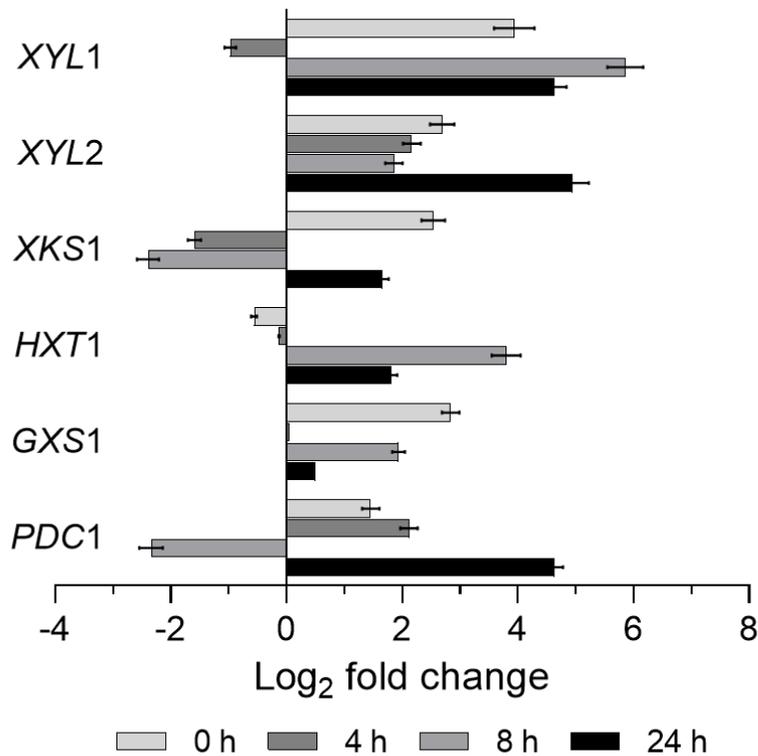


Figura 38. Regulación de la expresión de los genes *XYL1*, *XYL2*, *XKS1*, *HXT1*, *GXS1* y *PDC1* en Clu_Ev3 respecto a *C. lusitaniae* wt en medio MMB con relación 2:1 de xilosa y glucosa en condiciones aerobias a 30 °C y 150 rpm.

Por otro lado, cuando se evaluaron los niveles de expresión de los genes involucrados en el transporte de xilosa (*HXT1* y *GXS1*) se encontró que sus niveles de expresión aumentaron a las 8 h, lo que corresponde con el inicio del consumo acelerado de xilosa (**Figura 39**). Esto permite determinar que los genes seleccionados están relacionados con el transporte de la xilosa en *C. lusitaniae*. En el caso particular de *GXS1*, su expresión disminuyó durante el consumo de glucosa a las 4 h, lo que implicaría que este gen es susceptible a regulación por parte de esta hexosa (**Figura 38**)

El gen *GXS1* se ha expresado en *S. cerevisiae* para entender su regulación y funcionalidad. Se demostró que los transcritos del gen *GXS1* son inestables en presencia de glucosa, debido a que, como evento evolutivo, las levaduras limitan la síntesis de proteínas que ayudan a metabolizar fuentes de carbono que no son tan

importantes como la glucosa (Leandro et al., 2008; Sharma et al., 2018). Así mismo, *GXS1* parece estar regulado por el factor de transcripción Snf1, el cual es gluco-dependiente. Esta proteína evita la expresión de genes que no son requeridos durante el consumo de la glucosa (Lin, 2021).

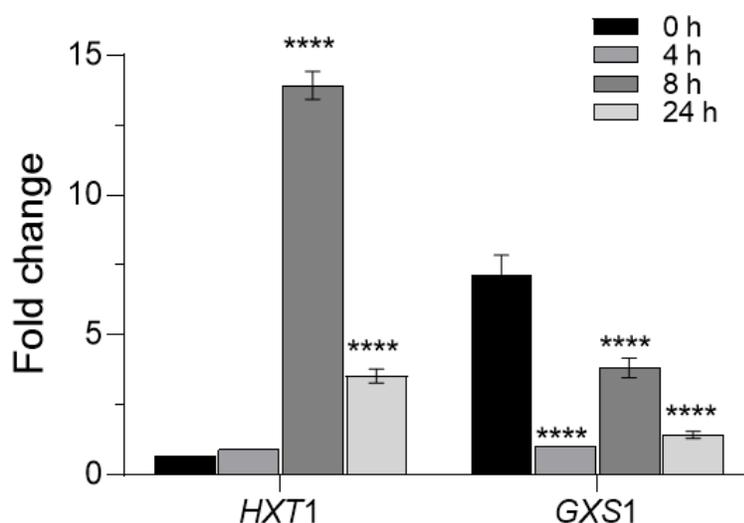


Figura 39. Niveles de expresión de los genes *HXT1* y *GXS1* en *C. lusitaniae* Ev3 respecto a la cepa wt crecidas en MMB suplementado con 2% xilosa y 1% glucosa. Control endógeno: *ADH1*. (**** $p < 0.0001$).

Para observar si había cambios en la expresión en el gen *PDC1*, un gen central en la fermentación alcohólica, se llevaron a cabo experimentos de PCR cuantitativa. De acuerdo con los resultados obtenidos, *PDC1* es expresado entre 2.5 a 15 veces más en la cepa Clu_Ev3 que en la cepa silvestre a las 0, 4 y 24 h (**Figura 40**). La expresión de este gen se observó a las 0 h cuándo las células venían de un medio con glucosa y xilosa, a las 4 h, dónde se consumió exclusivamente glucosa, y a las 24 h, dónde se consumió exclusivamente xilosa (**Figura 38**). Se observó una disminución en los niveles de expresión del gen a las 8 h de cultivo, lo que se ha asociado al momento dónde ocurre el cambio de consumo de glucosa a consumo de xilosa durante la cinética. Esto podría explicarse debido a la disminución del flujo metabólico hacia la parte baja de la glucólisis debido al lento consumo de xilosa y con bajos niveles de metabolitos activadores. Adicionalmente, también se ha

reportado que el flujo metabólico puede ser bajo debido a que las células parecen cambiar su respuesta fermentativa a una respuesta respiratoria en ausencia de glucosa y presencia de xilosa (Songdech et al., 2022). La recuperación de la expresión a las 24 h de cultivo, indicaría que el flujo río abajo del metabolismo aumentó debido que las células se recuperaron completamente de la represión por parte de la glucosa, lo que implicó un aumento del flujo metabólico río abajo y permitió que aumentara la expresión de *PDC1* en presencia de xilosa

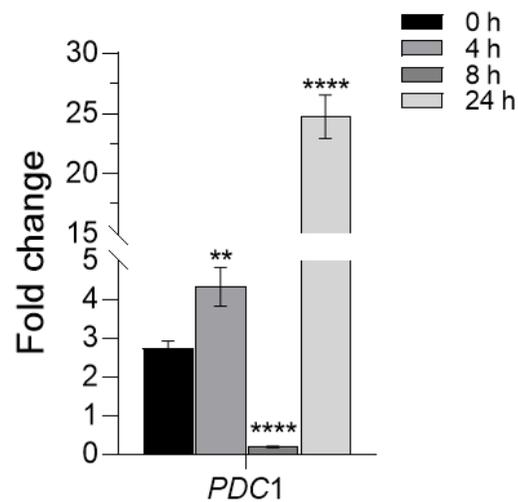


Figura 40. Nivel de expresión del gen *PDC1* en *C. lusitaniae* Ev3 respecto a la cepa control crecidas en MMB suplementado con 2% xilosa y 1% glucosa. Control endógeno: *ADH1*. (**** $p < 0.0001$).

Objetivo IV: Producir etanol en los cultivos de las cepas mejoradas de *C. lusitaniae* en sacarificados lignocelulósicos.

7.14. Establecimiento del diseño experimental para las mejores condiciones de sacarificación de BGC (Diseño central compuesto)

Con el fin de evaluar la producción de xilitol y etanol de la cepa Clu_Ev3 usando sacarificados enzimáticos de BGC, se llevó a cabo la estandarización de las condiciones de sacarificación de este residuo.

Tras realizar los ensayos bajo las condiciones estipuladas, se llevó a cabo la medición de azúcares reductores. En la corrida 10 que corresponde a 118.7 FPU y 50 °C, se obtuvieron 16.1 g/L, la mayor cantidad de azúcares reductores liberados. Se observó que en temperaturas por debajo y arriba de los 50 °C, sumadas a una baja cantidad de actividad FPU (corridas 2 y 6) se obtuvieron concentración de azúcares reductores bajas, acumulando 11.19 y 11.74 g/L de azúcares, respectivamente (**Figura 41**).

Dentro de los comportamientos observados, se corroboró que 50 °C y actividades entre los 50 – 118 FPU, permitieron la liberación de 15 – 16 g/L de azúcares reductores después de 12 h de incubación. Con ayuda de la gráfica de contorno obtenida (**Figura 42**), se puede apreciar que el punto máximo (área oscura), corresponde a aproximadamente 118.7 FPU y 50 °C para obtener una concentración cercana a los 16 g/L de azúcares reductores.

Se realizó un análisis ANOVA de una vía con el fin de encontrar cuáles eran las corridas que presentaban diferencias significativas respecto al control (**Figura 41**). Como control se usaron los puntos centrales del diseño, es decir, las corridas 1, 3 y 6, cuyas condiciones correspondían a 55 FPU y 50 °C. De acuerdo con los resultados obtenidos, la corrida 10 es estadísticamente significativa respecto al control por mostrar mayor cantidad de azúcares reductores con un *p*-value de

0.0132. Por otro lado, las corridas 2, 7, 8 y 9 fueron significativas ($p < 0.001$) respecto al control por poseer menor cantidad de azúcares reductores. Finalmente, las corridas 4, 5 y 11 no mostraron diferencias significativas respecto al control. Estas corridas corresponden a mayor cantidad de FPU o temperatura, lo que aumentaría los costos de la sacarificación (**Tabla 18**).

Tabla 18. Azúcares liberados y rendimientos de los experimentos del diseño central compuesto para definir las mejores condiciones de sacarificación del bagacillo de caña.

Corrida	FPU	°C	FPU/g BGC	Azúcares (g/L)	Rendimiento (g azúcares/g BGC)
1	55.0	50	110	14.9	0.745
2	10.0	60	20	11.2	0.560
3	55.0	50	110	15.3	0.765
4	100.0	40	200	15.0	0.750
5	55.0	64	110	14.9	0.745
6	55.0	50	110	14.9	0.745
7	8.6	50	17.3	12.6	0.630
8	10.0	40	20	11.7	0.585
9	55.0	36	110	13.1	0.655
10	118.7	50	237.4	16.1	0.805
11	100.0	60	200	14.5	0.725

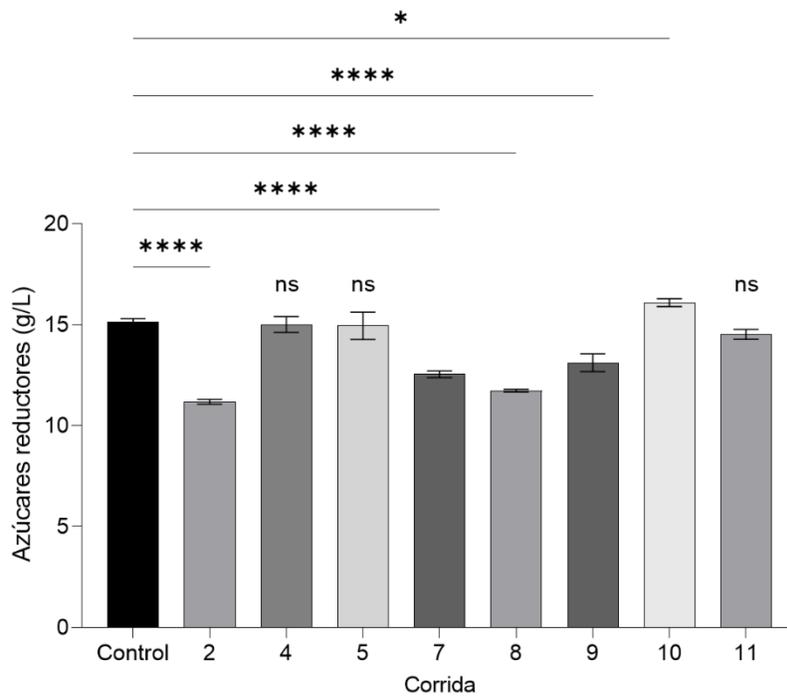


Figura 41. Azúcares reductores obtenidos de la sacarificación de BGC después de 12 h de incubación a 150 rpm en las condiciones correspondientes de cada corrida.

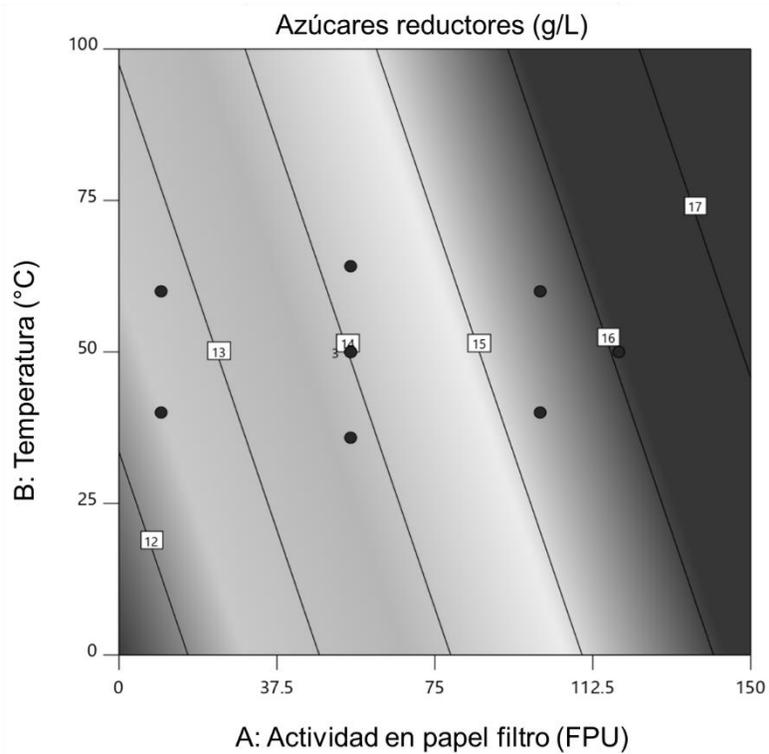


Figura 42. Gráfica de contorno donde se muestran las concentraciones de azúcares obtenidas en cada una de las corridas del diseño central compuesto.

Se realizó un análisis de optimización con los resultados obtenidos con el fin de lograr una sacarificación estandarizada donde se obtuvieran entre 15 – 16 g/L de azúcares reductores usando una cantidad de actividad enzimática menor. De acuerdo con el análisis realizado, 100 FPU y 50 °C son necesarias durante 12 h para el resultado deseado (**Figura 43**).

Dado que la corrida 10 fue la que presentó mayor concentración de azúcares (**Figura 41**), pero es la que requiere mayor cantidad de FPU (**Tabla 18**), se descarta por el gasto que representa el uso de 237.4 FPU/g BGC. Es por esto, que se decidió usar las condiciones del control (55 FPU y 50 °C) para futuras sacarificaciones de BGC a pesar de sacrificar 1 g/L de azúcares.

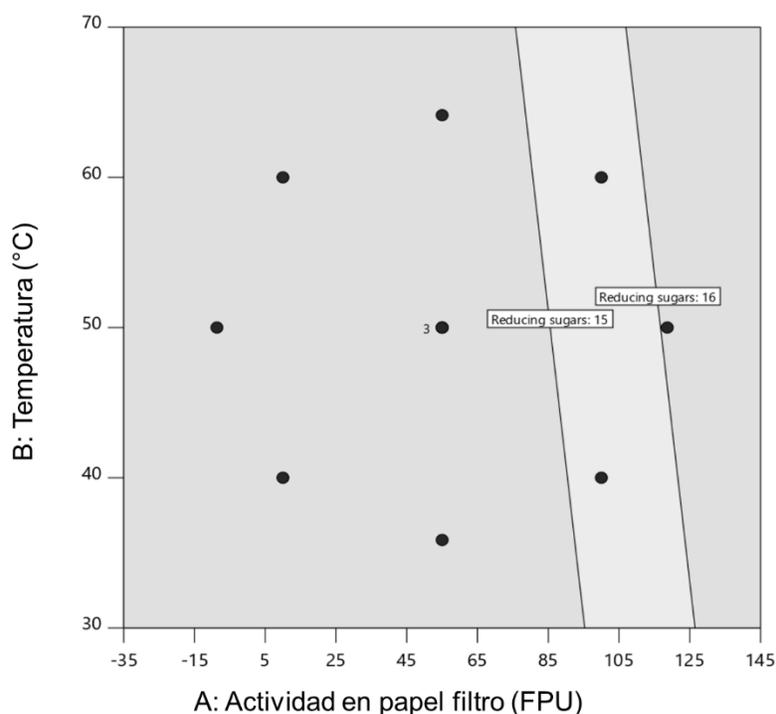


Figura 43. Optimización de la sacarificación de BGC en el software Desing expert v 11.0.

Cuando se analizó el perfil de azúcares por medio de HPLC para cada corrida, se pudo observar que hubo presencia de celopentosa, xilosa y glucosa con un

promedio de 30, 30 y 40%, respectivamente (**Figura 44**). En ninguno de los casos se pudo observar la acumulación de celobiosa, probablemente debido a que es un disacárido de rápida hidrólisis y baja acumulación cuando se cuenta con organismos con presencia de β -glucosidasas.

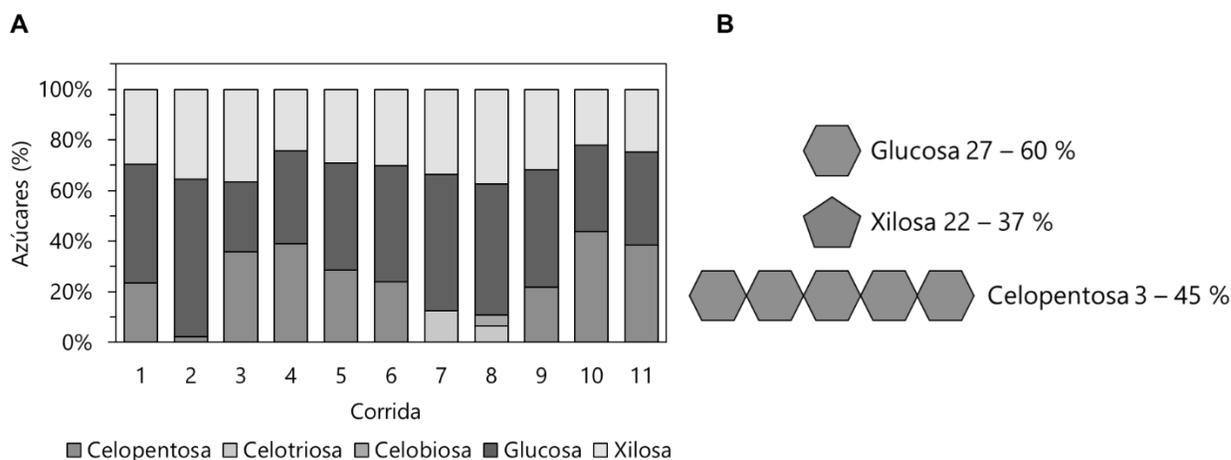


Figura 44. (A) Perfil de azúcares en los experimentos de sacarificación de BGC del diseño central compuesto y (B) Intervalos de la concentración de los principales azúcares en los experimentos de sacarificación.

Con el fin de aumentar la concentración de azúcares en los sacarificados y evitar un proceso que implicara mayores gastos energéticos, se estableció un proceso de sacarificación por lotes consecutivos. El proceso de sacarificación implicó que una vez culminadas las 12 h de la primera sacarificación, se agregó más BGC (2% p/v) y más enzima (55 FPU) en condiciones estériles y se continuó con la sacarificación a 50 °C durante 12 h. Esto se realizó 3 veces consecutivas. Bajo estas condiciones se obtuvieron sacarificados con una concentración de 33.45 g/L de azúcares reductores, donde la glucosa y xilosa estuvieron en concentraciones de 21.85 y 11.6 g/L, respectivamente.

Cabe mencionar que, como funciones operativas, se recomienda almacenar el sacarificado a 4 °C durante 18 h para favorecer la sedimentación de la enzima y su excipiente. Una vez terminado el periodo de refrigeración, se decanta el sacarificado clarificado en condiciones asépticas y es sometido a un proceso de esterilización

por autoclave. Análisis de HPLC realizados en las muestras del sacarificado demostraron que la esterilización no caramelizó los azúcares presentes.

7.15. Cinéticas de producción con sacarificados de bagacillo de caña

Se evaluó la acumulación de bioproductos por *C. lusitaniae* wt y Clu_Ev3 usando como sustrato sacarificados de BGC. Estas dos cepas fueron comparadas con dos modelos fermentativos: *S. cerevisiae* y *S. stipitis*.

Las 3 levaduras del tipo no-*Saccharomyces* presentaron mayor crecimiento y consumo de sustrato comparadas con *S. cerevisiae*. Esto indica que *S. cerevisiae* no está usando totalmente los azúcares disponibles (**Figura 45**).

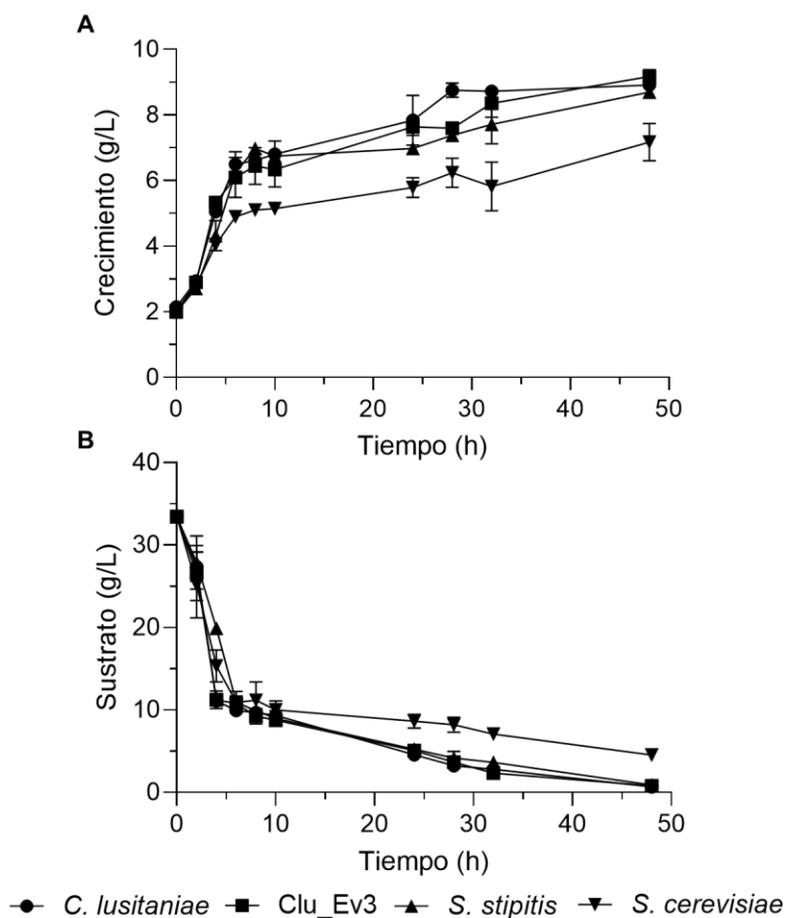


Figura 45. (A) Crecimiento y (B) consumo de sustrato por *C. lusitaniae* wt, Clu_Ev3, *S. stipitis* y *S. cerevisiae* en condiciones microaerobias a 30 °C y 150 rpm.

Con el objetivo de corroborar cómo fueron consumidos los diferentes azúcares, se evaluaron sus concentraciones por HPLC en cada cepa de estudio (**Figura 46**). Se puede observar que todas las cepas consumieron la glucosa disponible dentro de las primeras 6 h de proceso (**Figura 46a**). En contraste, la xilosa fue consumida de forma similar por *C. lusitaniae* wt, Clu_Ev3 y *S. stipitis*, que han sido ampliamente reportadas por consumir de forma eficiente la xilosa (Ochoa-Chacón et al., 2021; Radecka et al., 2015; Veras et al., 2017).

Por otro lado, la acumulación de etanol y xilitol fue evaluada en el medio de cultivo (**Figura 46**). Se observó que Clu_Ev3 llegó a su punto máximo de acumulación de xilitol en menor tiempo en comparación a las demás cepas, seguida por *C. lusitaniae* wt y por *S. stipitis* (**Figura 46c**). En cuanto a la acumulación de etanol, a las 10 h, Clu_Ev3, *C. lusitaniae* wt y *S. cerevisiae* llegaron al mismo punto en acumulación de este producto, a excepción de *S. stipitis* cuya acumulación fue mucho más lenta a lo largo de la cinética (**Figura 46d**).

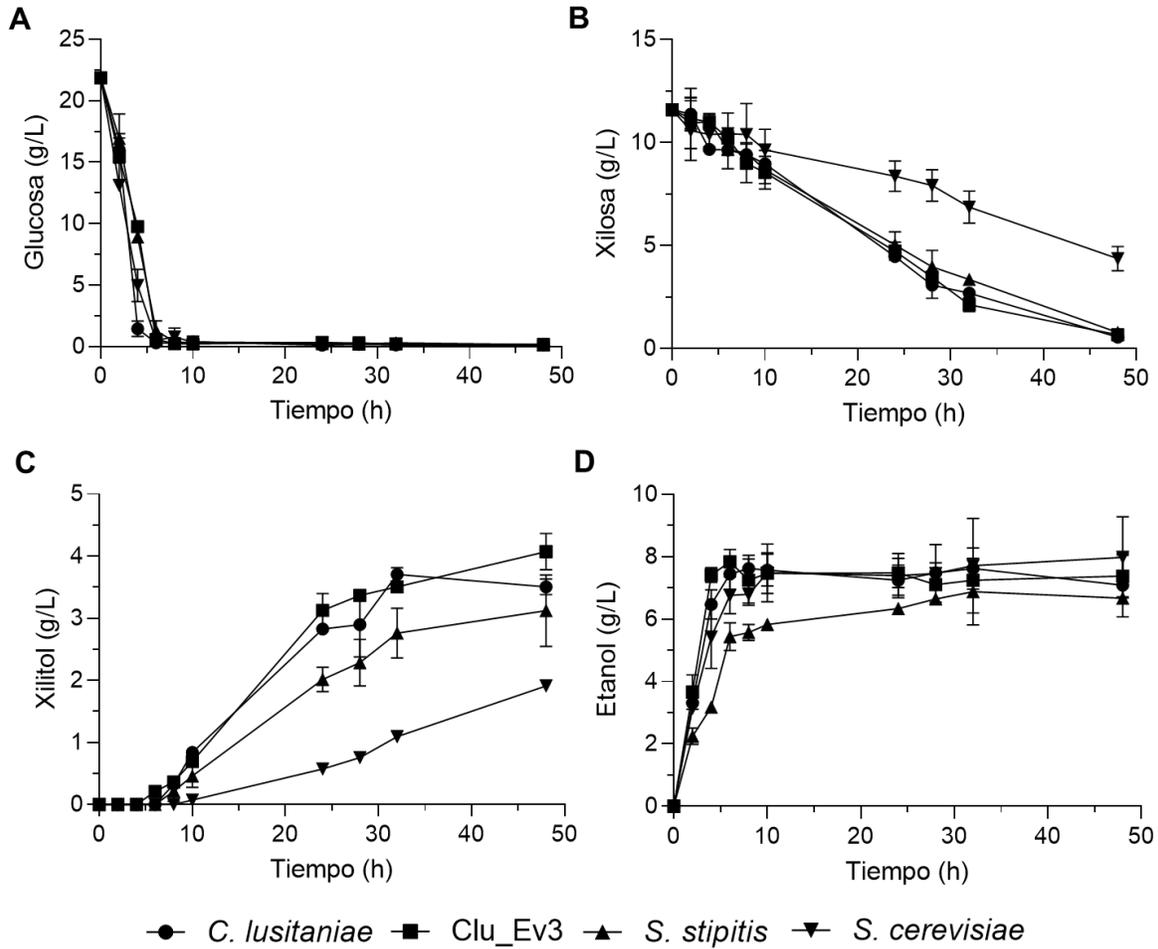


Figura 46. Consumo de (a) glucosa y (b) xilosa y producción de (c) xilitol y (d) etanol por *C. lusitaniae* wt, *Clu_Ev3*, *S. stipitis* y *S. cerevisiae* en condiciones microaerobias a 30 °C y 150 rpm.

Derivado de estas cinéticas, se evaluaron y compararon los parámetros cinéticos de cada una de las cepas de estudio (**Tabla 19**). Se encontró que *S. stipitis* y *S. cerevisiae* presentaron rendimientos de xilitol significativamente menores respecto a *C. lusitaniae* wt. *Clu_Ev3* mantuvo un rendimiento mayor a la cepa wt bajo las condiciones de estudio.

Una de las características de la cepa *Clu_Ev3* había sido el aumento de la productividad de etanol, en condiciones microaerobias este comportamiento se sigue manteniendo. Aunque la sensibilidad del modelo estadístico no la considere significativamente mayor.

Tabla 19. Parámetros cinéticos de las fermentaciones usando SBC como sustrato.

Parámetro	<i>C. lusitaniae</i>	Clu_Ev3	<i>S. stipitis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
$Y_{\text{etanol/azúcar}}^a$	0.321 ± 0.01	0.346 ± 0.02	0.245 ± 0.02	0.332 ± 0.03
$Y_{\text{xilitol/xilosa}}^b$	0.404 ± 0.02	0.475 ± 0.04	0.333 ± 0.03*	0.343 ± 0.00*
$Y_{\text{biomasa/azúcar}}^c$	0.206 ± 0.00	0.218 ± 0.01	0.205 ± 0.01	0.177 ± 0.02
q_{glucosa}^d	0.828 ± 0.07	0.878 ± 0.13	0.809 ± 0.04	1.238 ± 0.05*
q_{xilosa}^e	0.034 ± 0.00	0.031 ± 0.00	0.032 ± 0.00	0.032 ± 0.00
r_{etanol}^f	0.952 ± 0.04	1.306 ± 0.06	0.239 ± 0.00*	1.004 ± 0.271
r_{xilitol}^g	0.115 ± 0.00	0.085 ± 0.01*	0.065 ± 0.01**	0.040 ± 0.00***

^a $g_{\text{EtOH}}/g_{\text{glucosa+xilosa}}$; ^b $g_{\text{XilOH}}/g_{\text{xilosa}}$; ^c $g_{\text{biomasa}}/g_{\text{glucosa+xilosa}}$; ^d g_{xilosa}/L^*h ; ^e $g_{\text{xilosa}}/g_{\text{biomasa}}^*h$; ^f g_{EtOH}/L^*h ; ^g g_{XilOH}/L^*h
 * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

Veras et al. (2017) compararon el consumo de xilosa de algunas levaduras. *C. tenuis* mostró un rendimiento de xilitol de 0.30 $g_{\text{XilOH}}/g_{\text{xilosa}}$ y una velocidad específica de consumo de xilosa de 0.02 $g_{\text{xilosa}}/g_{\text{biomasa}}^*h$. Estos valores comparados con los obtenidos en este trabajo para *C. lusitaniae* wt y Clu_Ev3 son muy inferiores. Por otro lado, *Debaryomyces hansenii* y *Candida guilliermondii*, creciendo en sacarificados destoxificados de paja de colza mostraron rendimientos de etanol y xilitol entre 0.12 – 0.18 $g_{\text{EtOH}}/g_{\text{xilosa}}$ y 0.42 $g_{\text{XilOH}}/g_{\text{azúcar}}$ respectivamente. En estas condiciones Clu_Ev3 está 13% por encima de dichas levaduras en cuanto a rendimiento de xilitol y su rendimiento de etanol es al menos 3 veces superior al de *D. hansenii* y *C. guilliermondii* (López-Linares et al., 2018). Finalmente, se comparó el comportamiento de *C. lusitaniae* wt y Clu_Ev3 con cepas de *S. cerevisiae* modificadas. Lee et al. (2017) obtuvieron una cepa modificada de *S. cerevisiae* que fue crecida en hidrolizados celulósicos, esta levadura mostró una productividad de etanol de 1.36 g_{EtOH}/L^*h , sólo 4% mayor a la observada para Clu_Ev3 (1.31 g_{EtOH}/L^*h). Por el contrario, el rendimiento de etanol de Clu_Ev3 es 12% superior al de la cepa Sc DX 123 (Lee et al., 2017). Estos resultados demuestran que *C. lusitaniae* wt y Clu_Ev3 son levaduras con potencial para el aprovechamiento de sacarificados de residuos lignocelulósicos.

7.16 Tolerancia de *C. lusitaniae* wt y Clu_Ev3 a diferentes concentraciones de xilosa y etanol

Con el fin de conocer cuáles son los niveles máximos tolerables de etanol por Clu_Ev3, que no afecten su viabilidad, se realizaron experimentos de incubación por 1 h en concentraciones conocidas de etanol. Tras este periodo de incubación, se llevaron a cabo diluciones seriadas y siembras en placa por extensión y por goteo (**Figura 47**). En la siembra por extensión se midió la supervivencia de la levadura por recuento (**Tabla 20**). Se usó a *S. cerevisiae* como control positivo, pues esta levadura de forma nativa ha sido reportada como tolerante a concentraciones de entre 7 – 12 % de etanol (Jhariya et al., 2021) y a *C. lusitaniae* wt como control negativo.

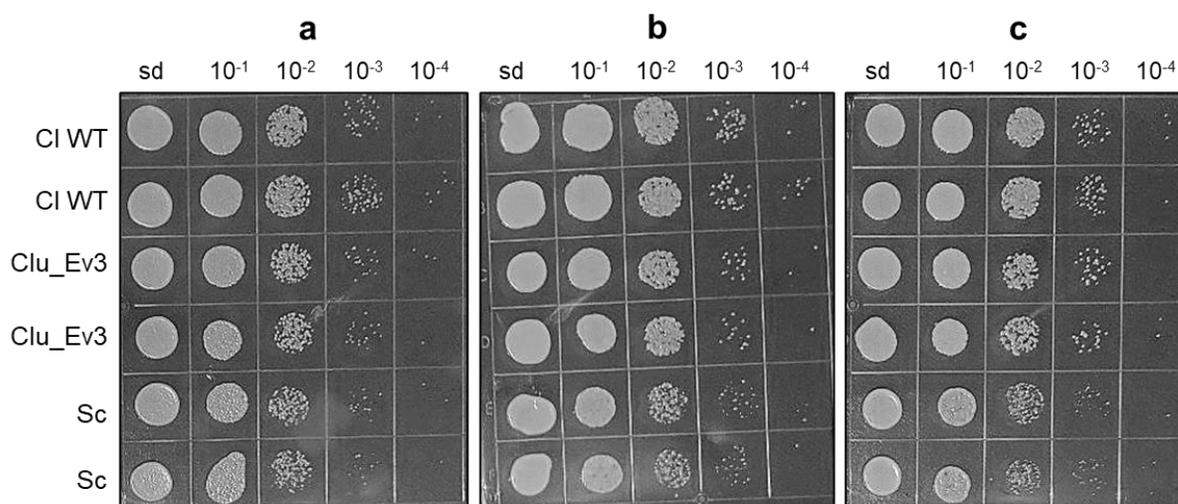


Figura 47. Crecimiento de *C. lusitaniae* wt, Clu_Ev3 y *S. cerevisiae* en medio YPD en etanol (%): (a) 0, (b) 5, (c) 10. La levadura se incubó durante 1 h a dichas concentraciones de etanol y posteriormente fueron sembradas en medio YPD e incubadas durante 18 h 30 °C.

Se observó que el crecimiento de Clu_Ev3 y *C. lusitaniae* wt no fue afectado tras ser incubadas por 1 h en concentraciones de hasta 10% de etanol. De este resultado se destaca la competitividad que podría tener *C. lusitaniae* como agente fermentador en procesos de producción de bioetanol.

Tabla 20. Supervivencia de *C. lusitaniae* wt, Clu_Ev3 y *S. cerevisiae* 2-24D tras ser incubadas 1 h en diferentes concentraciones de EtOH.

Cepa/ Concentración EtOH (%)	<i>C. lusitaniae</i> wt		Clu_Ev3		<i>S. cerevisiae</i>	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴
0	304	84	368	51	440	38
5	576	63	528	51	200	22
10	680	76	440	42	189	27
20	0	0	0	0	12	2
30	0	0	0	0	0	0

Se evaluó la tolerancia a xilosa de las cepas Clu_Ev3 y *C. lusitaniae* wt, el control positivo en esta ocasión fue *S. stipitis*. Este experimento se llevó a cabo debido a que la xilosa ha sido reportada como tóxica para las levaduras y logra afectar su viabilidad y capacidad de consumo (Feng et al., 2021; Nielsen et al., 2015). Para evaluar la tolerancia, se usaron diluciones seriadas de un cultivo de cada una de las cepas y se sembraron en placas de medio YNB con diferentes porcentajes de xilosa (1, 2, 3, 4 y 5) (**Figura 48**). Se observó que Clu_Ev3 y *C. lusitaniae* presentaron crecimiento hasta concentraciones de 5% de xilosa, indicando que al menos hasta estas concentraciones puede ser usada (**Figura 48e**).

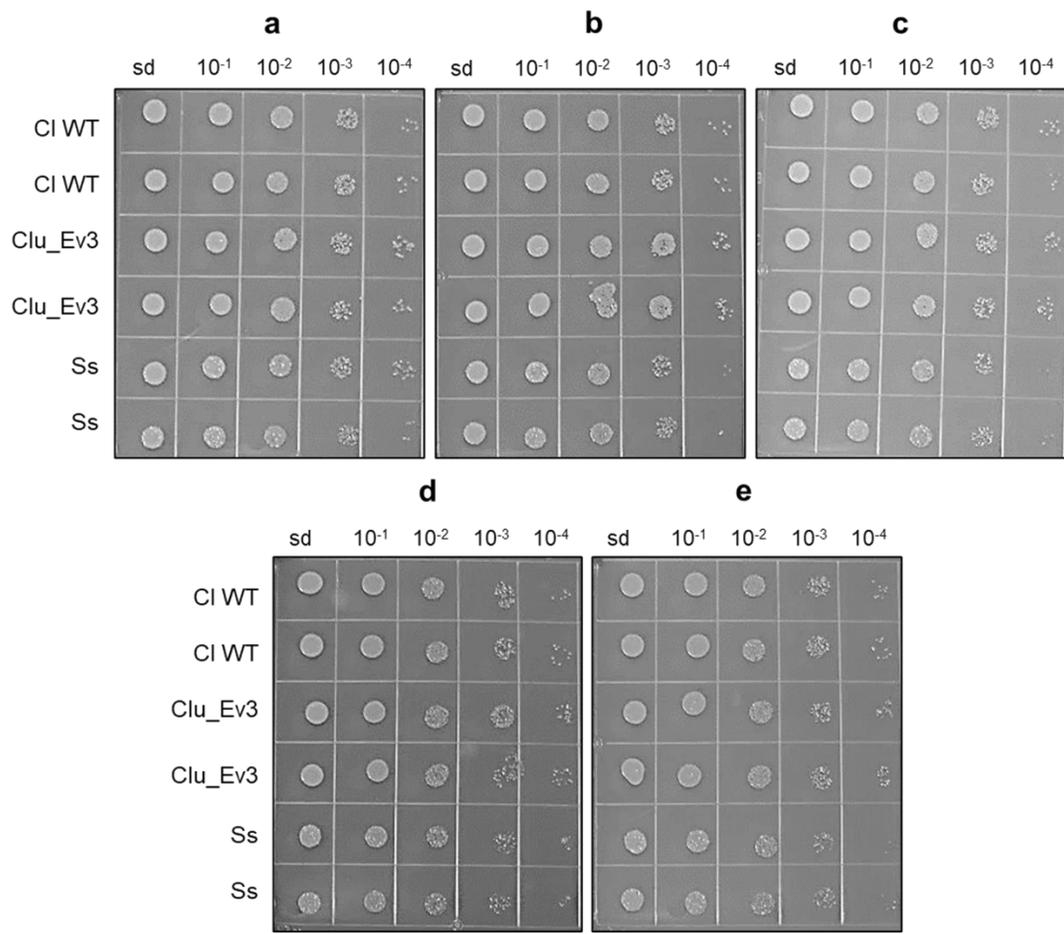


Figura 48. Crecimiento de *C. lusitaniae* wt, *Clu_Ev3* y *S. stipitis* en medio YNB suplementado con xilosa (%): (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4 y (e) 5 durante 48 h a 30 °C.

CONCLUSIONES

Para la modificación genética de *C. lusitaniae* CDBB-L-2031 los plásmidos de expresión con marcadores de selección para uracilo y leucina no pueden ser utilizados ya que esta levadura es protótrofa para estos aminoácidos.

C. lusitaniae CDBB-L-2031 es una levadura sensible a la anfotericina B y caspofungina en concentraciones iguales o superiores a los 0.25 µg/mL, y a fluconazol en concentraciones iguales o superiores a los 2 µg/mL. Esta levadura también es sensible a nourseotricina en concentraciones iguales o superiores a los 2 µg/mL.

La nourseotricina fue seleccionada como el marcador de selección adecuado para el diseño de vectores de expresión para *C. lusitaniae* debido a su naturaleza de antibiótico de amplio espectro y que aún no se han reportado mecanismos de resistencia en levaduras de ambientes clínicos a este antibiótico.

Se estableció el método de selección de levaduras productoras de etanol en placa de Petri. Se sugiere utilizar el medio YNB mezclado con una población 1×10^6 células de *S. cerevisiae*/mL de medio y suplementado con una fuente de carbono no fermentable por *S. cerevisiae*. Se sugiere inocular en la placa 100 µL de las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} de *C. lusitaniae* e incubar a 30 °C durante 48 h. Las colonias positivas presentarán un halo de crecimiento de *S. cerevisiae* en el interior del agar.

Se diseñó *in silico* un vector de integración al genoma de *C. lusitaniae* para insertar el gen optimizado de la xilosa isomerasa (*XylA*), dentro de nuestro conocimiento es el primer vector de expresión para esta levadura.

Las cepas Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3 presentaron velocidades específicas de consumo de sustrato aumentadas en 2 – 4 veces respecto a la cepa control. Estas

cepas fueron obtenidas por el proceso de evolución adaptativa después de 13 rondas de crecimiento y aproximadamente 30 generaciones.

Las cepas evolucionadas Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3 incrementaron el rendimiento y la producción de xilitol respecto a la cepa control, lo que representó un aumento significativo de la productividad de 285%, aproximadamente. Este incremento estuvo relacionado con el aumento en las actividades específicas de XR, lo que sugiere que el proceso de evolución adaptativa generó un cambio en dicha actividad favoreciendo la producción de xilitol.

A pesar del aumento en la actividad de XR y XDH en las cepas Clu_Ev1, Clu_Ev2 y Clu_Ev3 no hubo acumulación de etanol, lo que podría indicar que estas actividades al mantenerse en un orden de magnitud por debajo de las presentadas por otras levaduras como *S. stipitis* y *C. shehatae*, no favorecen la acumulación de etanol.

Los análisis bioinformáticos arrojaron que *C. lusitaniae* posee homólogos de genes que codifican para transportadores de pentosas como de *HXT1* de *Scheffersomyces stipitis*, *GXS1* de *Candida intermedia* y *XYLT* de *Candida parapsilosis*.

La expresión de los genes *XYL1*, *XYL2*, *HXT1*, *GXS1*, *XYLT* y *XKS1* en Clu_Ev3 creciendo en medio mínimo Breus suplementado con xilosa y glucosa en relación 2:1 está sujeta a regulación negativa por la presencia de glucosa en el medio de cultivo. Además, puede existir un efecto de inducción dependiente de la concentración de xilitol para *XYL2*.

Los genes de transportadores de xilosa *HXT1*, *GXS1* y *XYLT* estuvieron regulados positivamente por la presencia de xilosa, lo que podría indicar que juegan un papel fundamental en el transporte de esta pentosa.

Clavispora lusitaniae wt y Clu_Ev3 son potencialmente competentes respecto a otras levaduras en cuanto al aprovechamiento de sacarificados celulósicos ricos en glucosa y xilosa para la acumulación de bioproductos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aeling, K. A., Salmon, K. A., Laplaza, J. M., Li, L., Headman, J. R., Hutagalung, A. H., & Picataggio, S. (2012). Co-fermentation of xylose and cellobiose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(11), 1597–1604. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1169-y>
- Alshahni, M. M., Makimura, K., Yamada, T., Takatori, K., & Sawada, T. (2010). Nourseothricin acetyltransferase: A new dominant selectable marker for the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. *Medical Mycology*, 48(4), 665–668. <https://doi.org/10.3109/13693780903330555>
- Álvarez, C., Reyes-Sosa, F. M., & Díez, B. (2016). Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial Biotechnology*, 9(2), 149–156. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12346>
- Antony, A., & thottiam Vasudevan, R. (2018). A review on cellulose and its utilization from agro-industrial waste. *Drug Invention Today*, 10, 89–94.
- Arendrup, M. C., & Patterson, T. F. (2017). Multidrug-resistant *Candida*: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_3), S445–S451. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix131>
- Asner, S. A., Giulieri, S., Diezi, M., Marchetti, O., & Sanglard, D. (2015). Acquired multidrug antifungal resistance in *Candida lusitanae* during therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12), 7715–7722. <https://doi.org/10.1128/AAC.02204-15>
- Bae, J.-H., Kim, M.-J., Sung, B. H., Jin, Y.-S., & Sohn, J.-H. (2021). Directed evolution and secretory expression of xylose isomerase for improved utilisation of xylose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 223. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02073-y>
- Bianchini, I. de A., Sene, L., da Cunha, M. A. A., & Felipe, M. das G. de A. (2022). Short-term adaptation strategy improved xylitol production by *Candida guilliermondii* on sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. *BioEnergy Research*, 15(2), 1182–1194. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10324-x>
- Bonturi, N., Crucello, A., Viana, A. J. C., & Miranda, E. A. (2017). Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain. *Process Biochemistry*, 57, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.007>
- Borkowska, M., Białas, W., & Celińska, E. (2020). A new set of reference genes for comparative gene expression analyses in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, 20(7), foaa059. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa059>
- Brat, D., Boles, E., & Wiedemann, B. (2009). Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2304–2311. <https://doi.org/10.1128/AEM.02522-08>
- Caspeta, L., & Nielsen, J. (2015). Thermotolerant yeast strains adapted by laboratory evolution show trade-off at ancestral temperatures and preadaptation to other stresses. *mBio*, 6(4), e00431-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00431-15>
- Chapla, D., Parikh, B. S., Liu, L. Z., Cotta, M. A., & Kumar, A. K. (2015). enhanced cellulosic ethanol production from mild-alkali pretreated rice straw in SSF using *Clavispora NRRL Y-50464*. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 9(4), 381–388. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2015.1533>
- Chesson, A., & Forsberg, C. W. (1997). Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. En P. N. Hobson & C. S. Stewart (Eds.), *The Rumen Microbial Ecosystem* (pp. 329–381). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_8
- Cocotle-Ronzon, Y., Zendejas-Zaldo, M., Castillo-Lozano, M. L. del, & Aguilar-Uscanga, M. (2011). Preliminary characterization of xylose reductase partially purified by reversed micelles from *Candida*

- tropicalis* IEC5-ITV, an indigenous xylitol-producing strain. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 2(1), Art. 1. <https://doi.org/10.4236/aces.2012.21002>
- Cunha, J. T., Soares, P. O., Romaní, A., Thevelein, J. M., & Domingues, L. (2019). Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1360-8>
- Dasgupta, D., Bandhu, S., Adhikari, D. K., & Ghosh, D. (2017). Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. *Microbiological Research*, 197, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.012>
- Defosse, T. A., Le Govic, Y., Vandeputte, P., Courdavault, V., Clastre, M., Bouchara, J.-P., Chowdhary, A., Giglioli-Guivarc'h, N., & Papon, N. (2018). A synthetic construct for genetic engineering of the emerging pathogenic yeast *Candida auris*. *Plasmid*, 95, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.11.001>
- Delgado Arcaño, Y., Valmaña García, O. D., Mandelli, D., Carvalho, W. A., & Magalhães Pontes, L. A. (2020). Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route. *Catalysis Today*, 344, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.07.060>
- Demers, E. G., Biermann, A. R., Masonjones, S., Crocker, A. W., Ashare, A., Stajich, J. E., & Hogan, D. A. (2018). Evolution of drug resistance in an antifungal-naive chronic *Candida lusitanae* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(47), 12040–12045. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807698115>
- Diao, L., Liu, Y., Qian, F., Yang, J., Jiang, Y., & Yang, S. (2013). Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *Saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution. *BMC Biotechnology*, 13(1), 110. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-110>
- Dunkel, N., Liu, T. T., Barker, K. S., Homayouni, R., Morschhäuser, J., & Rogers, P. D. (2008). A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryotic Cell*, 7(7), 1180–1190. <https://doi.org/10.1128/EC.00103-08>
- Espinoza-Acosta, J. L. (2020). Biotechnological production of xylitol from agricultural waste. *Biotecnia*, 22(1), 126–134. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i1.1160>
- Farwick, A., Bruder, S., Schadeweg, V., Oreb, M., & Boles, E. (2014). Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5159–5164. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323464111>
- Feng, H., Li, Y., Du, C., & Yuan, W. (2021). Effect of microaeration on cell growth and glucose/xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* from the imitate lignocellulosic-derived hydrolysate. *Process Biochemistry*, 101, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.11.025>
- Feng, X., & Zhao, H. (2013). Investigating xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* via ¹³C metabolic flux analysis. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 114. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-114>
- Ferea, T. L., Botstein, D., Brown, P. O., & Rosenzweig, R. F. (1999). Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17), 9721–9726. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9721>
- Gonia, S., Larson, B., & Gale, C. A. (2016). PCR-mediated gene modification strategy for construction of fluorescent protein fusions in *Candida parapsilosis*. *Yeast*, 33(2), 63–69. <https://doi.org/10.1002/yea.3141>
- Gorter, F. A., Derks, M. F. L., van den Heuvel, J., Aarts, M. G. M., Zwaan, B. J., de Ridder, D., & de Visser, J. A. G. M. (2017). Genomics of adaptation depends on the rate of environmental change in experimental yeast populations. *Molecular Biology and Evolution*, 34(10), 2613–2626. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx185>

- Grabek-Lejko, D., Ryabova, O. B., Oklejewicz, B., Voronovsky, A. Y., & Sibirny, A. A. (2006). Plate ethanol-screening assay for selection of the *Pichia stipitis* and *Hansenula polymorpha* yeast mutants with altered capability for xylose alcoholic fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 934–940. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0147-7>
- Gresham, D., & Hong, J. (2015). The functional basis of adaptive evolution in chemostats. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12082>
- Guo, J., & Tanaka, T. (2022). Energy security versus food security: An analysis of fuel ethanol-related markets using the spillover index and partial wavelet coherence approaches. *Energy Economics*, 112, 106142. <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2022.106142>
- Hemansi, Himanshu, Patel, A. K., Saini, J. K., & Singhania, R. R. (2022). Development of multiple inhibitor tolerant yeast via adaptive laboratory evolution for sustainable bioethanol production. *Bioresource Technology*, 344, 126247. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126247>
- Henrissat, B., & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(5), 637–644. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(97\)80072-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(97)80072-3)
- Jacobs, P. P., Geysens, S., Vervecken, W., Contreras, R., & Callewaert, N. (2009). Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using glycoSwitch technology. *Nature Protocols*, 4(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.213>
- Jhariya, U., Dafale, N. A., Srivastava, S., Bhende, R. S., Kapley, A., & Purohit, H. J. (2021). Understanding ethanol tolerance mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* to enhance the bioethanol production: Current and Future Prospects. *BioEnergy Research*, 14(2), 670–688. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10228-2>
- Jiang, X., He, P., Qi, X., Lin, Y., Zhang, Y., & Wang, Q. (2016). High-efficient xylitol production by evolved *Candida maltosa* adapted to corncob hemicellulosic hydrolysate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(12), 2994–2999. <https://doi.org/10.1002/jctb.4924>
- Jing, X., Xie, B., Chen, L., Zhang, N., Jiang, Y., Qin, H., Wang, H., Hao, P., Yang, S., & Li, X. (2018). Implementation of the CRISPR-Cas13a system in fission yeast and its repurposing for precise RNA editing. *Nucleic Acids Research*, 46(15), e90. <https://doi.org/10.1093/nar/gky433>
- Kim, H. K., & Pack, M. Y. (1989). Cloning and expression of *Cellulomonas fimi* β -glucosidase genes in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 11(5), 313–316. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90048-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90048-3)
- Kim, S. R., Kwee, N. R., Kim, H., & Jin, Y.-S. (2013). Feasibility of xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing endogenous aldose reductase (*GRE3*), xylitol dehydrogenase (*XYL2*), and xylulokinase (*XYL3*) from *Scheffersomyces stipitis*. *FEMS Yeast Research*, 13(3), 312–321. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12036>
- Kobayashi, H., Kaiki, H., Shrotri, A., Techikawara, K., & Fukuoka, A. (2016). Hydrolysis of woody biomass by a biomass-derived reusable heterogeneous catalyst. *Chemical Science*, 7(1), 692–696. <https://doi.org/10.1039/C5SC03377B>
- Kochupurakkal, B. S., & Iglehart, J. D. (2013). Nourseothricin N-Acetyl Transferase: A positive selection marker for mammalian cells. *PLOS ONE*, 8(7), e68509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068509>
- Kuyper, M., Harhangi, H. R., Stave, A. K., Winkler, A. A., Jetten, M. S. M., de Laat, W. T. A. M., den Ridder, J. J. J., Op den Camp, H. J. M., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2003). High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: The key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Research*, 4(1), 69–78. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00141-7)
- Lachance, M. A., Daniel, H. M., Meyer, W., Prasad, G. S., Gautam, S. P., & Boundy-Mills, K. (2003). The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitanae* is unusually

- polymorphic. *FEMS Yeast Research*, 4(3), 253–258. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00113-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00113-2)
- Leandro, M. J., Spencer-Martins, I., & Gonçalves, P. (2008). The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/xylose facilitator. *Microbiology*, 154(6), 1646–1655. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/015511-0>
- Lee, S.-M., Jellison, T., & Alper, H. S. (2012). Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5708–5716. <https://doi.org/10.1128/AEM.01419-12>
- Lee, S.-M., Jellison, T., & Alper, H. S. (2014). Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0122-x>
- Lee, Y.-G., Jin, Y.-S., Cha, Y.-L., & Seo, J.-H. (2017). Bioethanol production from cellulosic hydrolysates by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 228, 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.042>
- Lehman, S. S., Mladinich, K. M., Boonyakanog, A., Mima, T., Karkhoff-Schweizer, R. R., & Schweizer, H. P. (2016). Versatile nourseothricin and streptomycin/spectinomycin resistance gene cassettes and their use in chromosome integration vectors. *Journal of Microbiological Methods*, 129, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.018>
- Letscher-Bru, V., & Herbrecht, R. (2003). Caspofungin: The first representative of a new antifungal class. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(3), 513–521. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg117>
- Li, Q. Q., Skinner, J., & Bennett, J. E. (2012). Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR studies in *Candida glabrata* following azole treatment. *BMC Molecular Biology*, 13(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-13-22>
- Li, Y.-C., Li, G.-Y., Gou, M., Xia, Z.-Y., Tang, Y.-Q., & Kida, K. (2016). Functional expression of xylose isomerase in flocculating industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(6), 685–691. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.10.013>
- Lin, X. (2021). The regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Snf1 protein kinase on glucose utilization is in a glucose-dependent manner. *Current Genetics*, 67(2), 245–248. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01137-0>
- Liu, E., & Hu, Y. (2010). Construction of a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation. *Biochemical Engineering Journal*, 48(2), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.10.011>
- Liu, T., Huang, S., & Geng, A. (2018). Recombinant diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain development for rapid glucose and xylose cofermentation. *Fermentation*, 4(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030059>
- Liu, Z. L., Weber, S. A., & Cotta, M. A. (2013). Isolation and characterization of a β -glucosidase from a *Clavispora* strain with potential applications in bioethanol production from cellulosic materials. *BioEnergy Research*, 6(1), 65–74. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9236-9>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D490–D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Lombardi, L., Oliveira-Pacheco, J., & Butler, G. (2019). Plasmid-based CRISPR-Cas9 gene editing in multiple *Candida* species. *mSphere*, 4(2), e00125-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00125-19>
- López-Linares, J. C., Romero, I., Cara, C., Castro, E., & Mussatto, S. I. (2018). Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresource Technology*, 247, 736–743. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.139>

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275.
- Mathew, A. K., Abraham, A., Mallapureddy, K. K., & Sukumaran, R. K. (2018). Chapter 9—Lignocellulosic Biorefinery Wastes, or Resources? En T. Bhaskar, A. Pandey, S. V. Mohan, D.-J. Lee, & S. K. Khanal (Eds.), *Waste Biorefinery* (pp. 267–297). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63992-9.00009-4>
- Milne, S. W., Cheetham, J., Lloyd, D., Aves, S., & Bates, S. (2011). Cassettes for PCR-mediated gene tagging in *Candida albicans* utilizing nourseothricin resistance. *Yeast*, *28*(12), 833–841. <https://doi.org/10.1002/yea.1910>
- Min, K., Ichikawa, Y., Woolford, C. A., & Mitchell, A. P. (2016). *Candida albicans* gene deletion with a transient CRISPR-Cas9 system. *mSphere*, *1*(3), e00130-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00130-16>
- Morio, F., Pagniez, F., Lacroix, C., Miegville, M., & Le Pape, P. (2012). Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol $\Delta 5,6$ -desaturase (Erg3p) confer azole resistance: Characterization of two novel mutants with impaired virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(9), 2131–2138. <https://doi.org/10.1093/jac/dks186>
- Moysés, D. N., Reis, V. C. B., Almeida, J. R. M. de, Moraes, L. M. P. de, & Torres, F. A. G. (2016). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/ijms17030207>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimarães, P. M. R., Silva, J. P. A., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., Vicente, A., Domingues, L., & Teixeira, J. A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, *28*(6), 817–830. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>
- Nadai, C., Campanaro, S., Giacomini, A., & Corich, V. (2015). Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies during *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation in the presence of sulfite. *International Journal of Food Microbiology*, *215*, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.012>
- Nguyen, N., Quail, M. M. F., & Hernday, A. D. (2017). An efficient, rapid, and recyclable system for crispr-mediated genome editing in *Candida albicans*. *mSphere*, *2*(2), e00149-17. <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00149-17>
- Nielsen, F., Tomás-Pejó, E., Olsson, L., & Wallberg, O. (2015). Short-term adaptation during propagation improves the performance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and co-fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, *8*, 219. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0399-4>
- Obinata, H., Sugimoto, A., & Niwa, S. (2018). Streptothricin acetyl transferase 2 (Sat2): A dominant selection marker for *Caenorhabditis elegans* genome editing. *PLOS ONE*, *13*(5), e0197128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197128>
- Ochoa-Chacón, A., Martínez, A., Poggi-Varaldo, H. M., Villa-Tanaca, L., Ramos-Valdivia, A. C., & Ponce-Noyola, T. (2021). Xylose metabolism in bioethanol production: *Saccharomyces cerevisiae* vs non-*Saccharomyces* yeasts. *BioEnergy Research*, *15*, 905-923. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10340-x>
- Ochoa-Chacón, A., Ramos-Valdivia, A. C., Poggi-Varaldo, H. M., Villa-Tanaca, L., Martínez, A., & Ponce-Noyola, T. (2022). Fermentation performance of a Mexican native *Clavispora lusitaniae* strain for xylitol and ethanol production from xylose, glucose and cellobiose. *Enzyme and Microbial Technology*, *160*, 110094. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110094>
- Pasko, M. T., Piscitelli, S. C., & Van Slooten, A. D. (1990). Fluconazole: A new triazole antifungal agent. *DICP: The Annals of Pharmacotherapy*, *24*(9), 860–867. <https://doi.org/10.1177/106002809002400914>

- Patel, A., & Shah, A. R. (2021). Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 6(2), 108–128. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.02.001>
- Payen, C., Sunshine, A. B., Ong, G. T., Pogachar, J. L., Zhao, W., & Dunham, M. J. (2016). High-throughput identification of adaptive mutations in experimentally evolved yeast populations. *PLOS Genetics*, 12(10), e1006339. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006339>
- Peng, B., Huang, S., Liu, T., & Geng, A. (2015). Bacterial xylose isomerases from the mammal gut *Bacteroidetes* cluster function in *Saccharomyces cerevisiae* for effective xylose fermentation. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0253-1>
- Peng, B., Shen, Y., Li, X., Chen, X., Hou, J., & Bao, X. (2012). Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 14(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.12.001>
- Pérez-Brito, D., Magaña-Alvarez, A., Lappe-Oliveras, P., Cortes-Velazquez, A., Torres-Calzada, C., Herrera-Suarez, T., Larqué-Saavedra, A., & Tapia-Tussell, R. (2015). Genetic diversity of *Clavispora lusitaniae* isolated from *Agave fourcroydes* Lem, as revealed by DNA fingerprinting. *Journal of Microbiology*, 53(1), 14–20. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4373-4>
- Prajapati, A. S., Panchal, K. J., Pawar, V. A., Noronha, M. J., Patel, D. H., & Subramanian, R. B. (2018). Review on cellulase and xylanase engineering for biofuel production. *Industrial Biotechnology*, 14(1), 38–44. <https://doi.org/10.1089/ind.2017.0027>
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R. Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2015). Looking beyond *Saccharomyces*: The potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, 15(6). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>
- Ravella, S. R., Gallagher, J., Fish, S., & Prakasham, R. S. (2012). Overview on commercial production of xylitol, economic analysis and market trends. En S. S. da Silva & A. K. Chandel (Eds.), *D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization* (pp. 291–306). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_13
- Ribeiro, L. E., Albuini, F. M., Castro, A. G., Campos, V. J., de Souza, G. B., Mendonça, J. G. P., Rosa, C. A., Mendes, T. A. O., Santana, M. F., da Silveira, W. B., & Fietto, L. G. (2021). Influence of glucose on xylose metabolism by *Spathaspora passalidarum*. *Fungal Genetics and Biology*, 157, 103624. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103624>
- Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: Concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4), 337–353. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>
- Sanglard, D. (2016). Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Frontiers in Medicine*, 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2016.00011>
- Santiago Benítez, A. J. (2017). Estudio de la regulación de Xilosa Reductasa y Xilitol Deshidrogenasa en *Cryptococcus humicola* OJ-31 [Tesis de Maestría-Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería]. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/2534>
- Seike, T., Kobayashi, Y., Sahara, T., Ohgiya, S., Kamagata, Y., & Fujimori, K. E. (2019). Molecular evolutionary engineering of xylose isomerase to improve its catalytic activity and performance of micro-aerobic glucose/xylose co-fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1474-z>
- Senatham, S., Chamduang, T., Kaewchingduang, Y., Thammasittirong, A., Srisodsuk, M., Elliston, A., Roberts, I. N., Waldron, K. W., & Thammasittirong, S. N.-R. (2016). Enhanced xylose fermentation and hydrolysate inhibitor tolerance of *Scheffersomyces shehatae* for efficient ethanol production from non-detoxified lignocellulosic hydrolysate. *SpringerPlus*, 5(1), 1040. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2713-4>

- Sharma, N. K., Behera, S., Arora, R., & Kumar, S. (2016). Enhancement in xylose utilization using *Kluyveromyces marxianus* NIRE-K1 through evolutionary adaptation approach. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(5), 835–843. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1563-3>
- Sharma, N. K., Behera, S., Arora, R., & Kumar, S. (2017). Evolutionary adaptation of *Kluyveromyces marxianus* NIRE-K3 for enhanced xylose utilization. *Frontiers in Energy Research*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenrg.2017.00032>
- Sharma, N. K., Behera, S., Arora, R., Kumar, S., & Sani, R. K. (2018). Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(3), 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.10.006>
- Shen, J., Cowen, L. E., Griffin, A. M., Chan, L., & Köhler, J. R. (2008). The *Candida albicans* pescadillo homolog is required for normal hypha-to-yeast morphogenesis and yeast proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20918–20923. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809147105>
- Shen, Y., Chen, X., Peng, B., Chen, L., Hou, J., & Bao, X. (2012). An efficient xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained through adaptive evolution and its global transcription profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(4), 1079–1091. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4418-0>
- Singla, A., Paroda, S., Dhamija, S. S., Goyal, S., Shekhawat, K., Amachi, S., & Inubushi, K. (2012). Bioethanol production from xylose: Problems and possibilities. *Journal of Biofuels*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.5958/j.0976-3015.3.1.004>
- Songdech, P., Intasit, R., Yingchutrakul, Y., Butkinaree, C., Ratanakhanokchai, K., & Soontorngun, N. (2022). Activation of cryptic xylose metabolism by a transcriptional activator Znf1 boosts up xylitol production in the engineered *Saccharomyces cerevisiae* lacking xylose suppressor *BUD21* gene. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01757-w>
- Tanino, T., Hotta, A., Ito, T., Ishii, J., Yamada, R., Hasunuma, T., Ogino, C., Ohmura, N., Ohshima, T., & Kondo, A. (2010). Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(5), 1215–1221. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2870-2>
- Tiefenbacher, K. F. (2017). Chapter Three—Technology of Main Ingredients—Sweeteners and Lipids. En K. F. Tiefenbacher (Ed.), *Wafer and Waffle* (pp. 123–225). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809438-9.00003-X>
- Torroba, A. (2021). *Liquid biofuels atlas 2020-2021* (p. 35). Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture. <https://repositorio.ica.int/bitstream/handle/11324/18661/BVE21097939i.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
- Träff-Bjerre, K. L., Jeppsson, M., Hahn-Hägerdal, B., & Gorwa-Grauslund, M.-F. (2004). Endogenous NADPH-dependent aldose reductase activity influences product formation during xylose consumption in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 21(2), 141–150. <https://doi.org/10.1002/yea.1072>
- Umai, D., Kayalvizhi, R., Kumar, V., & Jacob, S. (2022). Xylitol: Bioproduction and Applications-A Review. *Frontiers in Sustainability*, 3. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/frsus.2022.826190>
- Veras, H. C. T., Campos, C. G., Nascimento, I. F., Abdelnur, P. V., Almeida, J. R. M., & Parachin, N. S. (2019). Metabolic flux analysis for metabolome data validation of naturally xylose-fermenting yeasts. *BMC Biotechnology*, 19(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0548-0>
- Veras, H. C. T., Parachin, N. S., & Almeida, J. R. M. (2017). Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0766-x>

- Verwaal, R., Buiting-Wiessenhaan, N., Dalhuijsen, S., & Roubos, J. A. (2018). CRISPR/Cpf1 enables fast and simple genome editing of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *35*(2), 201–211. <https://doi.org/10.1002/yea.3278>
- Vilela, L. de F., de Araujo, V. P. G., Paredes, R. de S., Bon, E. P. da S., Torres, F. A. G., Neves, B. C., & Eleutherio, E. C. A. (2015). Enhanced xylose fermentation and ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *AMB Express*, *5*(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0102-y>
- Vincent, B. M., Lancaster, A. K., Scherz-Shouval, R., Whitesell, L., & Lindquist, S. (2013). Fitness trade-offs Restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLOS Biology*, *11*(10), e1001692. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001692>
- Wang, R., Li, L., Zhang, B., Gao, X., Wang, D., & Hong, J. (2013). Improved xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperature through construction of a xylose isomerase pathway. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *40*(8), 841–854. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1282-6>
- Wasylenko, T. M., & Stephanopoulos, G. (2015). Metabolomic and ¹³C-metabolic flux analysis of a xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing xylose isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(3), 470–483. <https://doi.org/10.1002/bit.25447>
- Watanabe, S., Abu Saleh, A., Pack, S. P., Annaluru, N., Kodaki, T., & Makino, K. (2007). Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Microbiology*, *153*(9), 3044–3054. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007856-0>
- Watanabe, S., Pack, S. P., Saleh, A. A., Annaluru, N., Kodaki, T., & Makino, K. (2007). The positive effect of the decreased NADPH-preferring activity of xylose reductase from *Pichia stipitis* on ethanol production using xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *71*(5), 1365–1369. <https://doi.org/10.1271/bbb.70104>
- Watanabe, S., Saleh, A. A., Pack, S. P., Annaluru, N., Kodaki, T., & Makino, K. (2007). Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP+-dependent xylitol dehydrogenase. *Journal of Biotechnology*, *130*(3), 316–319. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.04.019>
- Watanabe, T., Watanabe, I., Yamamoto, M., Ando, A., & Nakamura, T. (2011). A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. *Bioresource Technology*, *102*(2), 1844–1848. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.087>
- Wei, N., Quarterman, J., Kim, S. R., Cate, J. H. D., & Jin, Y.-S. (2013). Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. *Nature Communications*, *4*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms3580>
- Xie, C.-Y., Yang, B.-X., Wu, Y.-J., Xia, Z.-Y., Gou, M., Sun, Z.-Y., & Tang, Y.-Q. (2020). Construction of industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains through combined approaches. *Process Biochemistry*, *96*, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.022>
- Xu, Y., Chi, P., Bilal, M., & Cheng, H. (2019). Biosynthetic strategies to produce xylitol: An economical venture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(13), 5143–5160. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09881-1>
- Yablochkova, E. N., Bolotnikova, O. I., Mikhailova, N. P., Nemova, N. N., & Ginak, A. I. (2003). The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. *Microbiology*, *72*(4), 414–417. <https://doi.org/10.1023/A:1025032404238>
- Yadav, P., Maharjan, J., Korpole, S., Prasad, G. S., Sahni, G., Bhattarai, T., & Sreerama, L. (2018). Production, purification, and characterization of thermostable alkaline xylanase from *Anoxybacillus*

- kamchatkensis* NASTPD13. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2018.00065>
- Yang, J., & Tavazoie, S. (2020). Regulatory and evolutionary adaptation of yeast to acute lethal ethanol stress. *PLoS ONE*, 15(11), e0239528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239528>
- Yegin, S. (2022). Microbial xylanases in xylooligosaccharide production from lignocellulosic feedstocks. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03190-w>
- Zha, J., Shen, M., Hu, M., Song, H., & Yuan, Y. (2014). Enhanced expression of genes involved in initial xylose metabolism and the oxidative pentose phosphate pathway in the improved xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(1), 27–39. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1350-y>
- Zhang, G.-C., Kong, I. I., Wei, N., Peng, D., Turner, T. L., Sung, B. H., Sohn, J.-H., & Jin, Y.-S. (2016). Optimization of an acetate reduction pathway for producing cellulosic ethanol by engineered yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(12), 2587–2596. <https://doi.org/10.1002/bit.26021>
- Zhang, M., Fan, W.-J., Wang, J.-Y., & Cao, L.-M. (2019). Optimized xylose isomerase uptake and expression level in *Saccharomyces cerevisiae* for improving ethanol production. *Applied Environmental Biotechnology*, 3(1). <https://doi.org/10.26789/AEB.2018.01.007>
- Zhang, Y.-H. P., & Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7), 797–824. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>
- Zhou, H., Cheng, J.-S., Wang, B. L., Fink, G. R., & Stephanopoulos, G. (2012). Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 14(6), 611–622. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.07.011>