

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN QUÍMICA PARA *Kluyveromyces marxianus* CEPA DU3 AISLADA DE MEZCAL

Luis A. Muñoz-Miranda, Anne C. Gschaedler-Mathis, Alejandro Pereira-Santana, Luis J. Figueroa-Yáñez. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Biotecnología Industrial, Zapopan, Jalisco, CP 45019. lfigueroa@ciatej.mx

Palabras clave: Transformación química, *K. marxianus*, plásmido

Introducción. *Kluyveromyces marxianus* es una levadura prometedora para hacer utilizada como plataforma de biología sintética, debido a su seguridad, rápido crecimiento y termotolerancia. De la cepa DU3 aislada en la fermentación tradicional del mezcal, se ha observado varias cualidades tales como su alta capacidad fermentativa alcohólica (Flores *et al.*, 2013; Fernández-López *et al.*, 2014) y la producción de ésteres (Kirchmyr *et al.*, 2017). El uso de herramientas estandarizadas de ingeniería genética y metabólica en *K. marxianus* son muy escasas, por lo que impide que se utilice como fábrica celular para la producción de metabolitos de interés biotecnológico.

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar un protocolo de transformación química en *K. marxianus* cepa DU3 aislada de mezcal.

Metodología. El establecimiento del protocolo de transformación para *K. marxianus* cepa DU3 se realizó a partir del plásmido pRS410_ARS (plásmido modificado a partir del plásmido pRS410, Addgene # 11258). A partir del método de Gietz, 2014, se optimizó una metodología con algunas modificaciones (McMillan, 2019). Se realizó un diseño experimental para incrementar el número de colonias transformadas. Dos factores fueron evaluados: concentración de plásmido (100, 500 y 1000 ng) y tiempo de recuperación (2 y 16 h) en incubadora a 30°C y 200 rpm. La mezcla de transformación también se modificó (40 % PEG, 0.1 M de LiAc, 1 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 70 mM de Ditiotreitól DTT), al igual que la temperatura de choque térmico y el tiempo (47 °C por 15 min). La selección de las colonias transformadas se realizó en medio YPD adicionado con 300 µg/mL de Geneticina G418 (Sigma Aldrich, A1720) como agente selectivo.

Resultados. La transformación con el plásmido pRS410_ARS en *K. marxianus* cepa DU3 fue exitosa. En la figura 1 podemos observar que hubo crecimiento de colonias con respecto al control (sin plásmido). Una eficiencia de transformación (No. De colonias transformadas/µg plásmido/10⁸ células) de 10⁵ se obtuvo en el tiempo de recuperación de 16 h con respecto a 10² en el tiempo de recuperación de 2h

(Tabla 1). Una diferencia significativa se observó con respecto al tiempo de recuperación ($p \leq 0.05$).

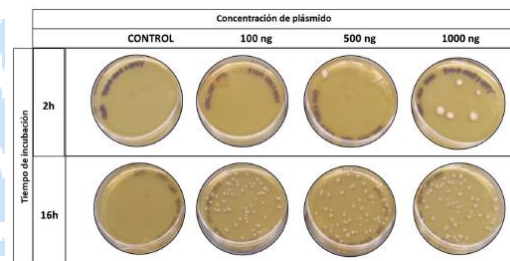


Fig. 1. Colonias transformadas con el plásmido pRS410_ARS.

En cuanto a la concentración del plásmido en el tiempo de incubación de 16 h, no hubo una diferencia en la eficiencia de transformación ($p > 0.05$).

Tabla 1. Eficiencia de transformación del plásmido pRS410_ARS en *K. marxianus* DU3

Tiempo de incubación	Concentración de plásmido (ng)		
	100	500	1000
2 h	0	0.2×10^2	2×10^2
16 h	2.64×10^5	2.48×10^5	1.34×10^5

Conclusiones. Un tiempo de recuperación de 16h posterior al choque térmico se obtuvo una mayor eficiencia de transformación.

Agradecimiento. El trabajo fue financiado mediante el fondo de Ciencia Básica de CONACYT con número de proyecto 252465.

Bibliografía.

- Flores, J.A., Gschaedler, A., Amaya-Delgado, L., Herrera-López, E. J., Arellano, M., Arrizon, J. 2013. *Bioresour Technol*, 146:267–73.
- Fernández López, C. L., Beaufort, S., Brandam, C. y Taillandier, P. 2014. *World J Microbiol Biotechnol*, 30(8):2223–9.
- Kirchmyr MR, Segura-García LE, Lappe-Oliveras P, Moreno-Terrazas R, De la Rosa M, Gschaedler A. 2017. *Food Science and Technology*, 79: 160-169.
- McMillan, D. 2019. Optimizing a transformation protocol for *Kluyveromyces marxianus*. The California Digital Library.
- Gietz RD. 2014. Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. En *Yeast protocols*. Wei-Xiao. Editorial Humana Press, New York. 33-45.