



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## ESTRATEGIA DE MODIFICACIÓN GÉNICA EN *PICHIA PASTORIS* PARA LA UTILIZACIÓN DE LACTOSA COMO FUENTE DE CARBONO

Mauricio Castillo-Galván, José Eduardo Almeyda-Carbajal, José María Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán  
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León  
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66450. martha.guerrero@uanl.edu.mx

*Palabras clave:* *Pichia pastoris*, lactosa, beta-galactosidasa

**Introducción.** La lactosa es un subproducto de la industria láctea que se acumula en grandes cantidades y representa un grave problema para su eliminación o su empleo alternativo (1). El mejoramiento de organismos a través del rediseño del metabolismo ha permitido generar productos de interés comercial a partir de subproductos industriales. *Pichia pastoris* es un microorganismo ampliamente reconocido para la expresión de genes heterólogos y recientemente empleado en el desarrollo de modelos metabólicos de organismos útiles en procesos industriales (2). *P. pastoris* puede emplear diversos compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, sin embargo no es capaz de metabolizar la lactosa.

Con el fin de utilizar residuos generados por la industria láctea, en este proyecto se propone realizar una modificación genética de la levadura *P. pastoris* para obtener cepas capaces de emplear la lactosa como fuente de carbono.

**Metodología.** Para plantear una estrategia viable de modificación genética en *P. pastoris*, se realizó un análisis *in silico* (KEGG, BLAST) para identificar la presencia de los genes implicados en la bioconversión de lactosa en el genoma de *P. pastoris* ya reportado. A su vez, se analizó la capacidad de *P. pastoris* KM71pPIC9 para utilizar glicerol, glucosa, galactosa y lactosa como fuentes de carbono a través de cinéticas de crecimiento en cultivos de 72 h. Se seleccionó un vector de expresión constitutivo del sistema de *P. pastoris* y se diseñaron secuencias génicas con codones preferenciales para *P. pastoris* y sitios de restricción adecuados para realizar la clonación molecular, además de secuencias que permitieran una expresión constitutiva e intracelular de las enzimas involucradas en el metabolismo de la lactosa.

**Resultados.** El análisis *in silico* realizado indicó que *P. pastoris* no posee algún gen relacionado con el metabolismo de la lactosa, datos confirmados por la ausencia de crecimiento presentado por la levadura en lactosa y galactosa. Por lo tanto se procedió a realizar una búsqueda en la base de datos de enzimas BRENDA de una beta galactosidasa ( $\beta$ gal) y una lactosa permeasa (LP) con propiedades enzimáticas adecuadas para llevar a cabo el metabolismo de lactosa en las condiciones de un cultivo típico de *P. pastoris* (pH 6, 30°C). De 74

enzimas  $\beta$ gal analizadas, un grupo de 9 enzimas cumplieron con los requisitos necesarios, seleccionando una  $\beta$ gal de la levadura *Kluyveromyces lactis*, debido a su alta relación filogenética con *P. pastoris*, a su vez se seleccionó la LP del mismo organismo. Ya obtenidas las secuencias de estos genes, éstas fueron sometidas a modificaciones *in silico* para utilizar codones preferenciales de *P. pastoris*, adicionar los elementos necesarios para una expresión constitutiva e intracelular de los genes  $\beta$ gal y LP, y llevar a cabo un estrategia de clonación en tres etapas, tal como se presenta en la figura 1. La secuencia génica diseñada y sintetizada (*GenScript*) ya ha sido clonada en sus dos primeras etapas.

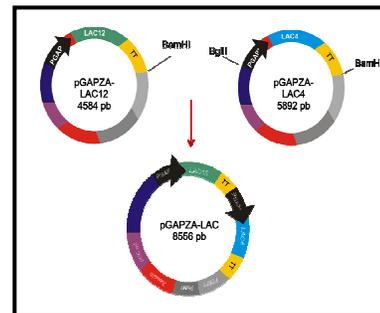


Fig. 1. Estrategia de clonación de los genes LAC12 (LP) y LAC4 ( $\beta$ gal) en pGAPZA.

**Conclusiones.** La ausencia de crecimiento de *P. pastoris* en lactosa, aunado al resultado del análisis *in silico* indican la incapacidad de permear y/o metabolizar la lactosa por esta levadura. Este análisis aportó los elementos necesarios para el diseño de una estrategia de clonación que permita una modificación en *P. pastoris* que impacte en el metabolismo de la lactosa.

**Agradecimientos.** Agradecemos el apoyo económico del fondo PAICYT-UANL. MCG agradece la beca otorgada por el CONACYT.

### Bibliografía.

1. Elliott DC, Wend CF, Alnajjar MS. (2001). Lactose Processing Technology – Creating New Utilization Opportunities. *Proceedings of the 38th Annual Marschall Cheese Seminar, "Tools of the Trade."* Visalia, California, EUA.
2. Sohn SB, Graf AB, Kim TY, Gasser B, Maurer M, Ferrer P, Mattanovich D, Lee SY. 2010. Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for *in silico* analysis of heterologous protein production. *Biotechnol. J.* 5: 705-715.