



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

19697

C 90/046

DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA OBTENCIÓN
DE UNA ENZIMA MICROBIANA QUE HIDROLICE
LA LACTOSA DE LECHE Y SUERO

Programa regional de Biotecnología para
América Latina y el Caribe

PNUD/ONUDI
NOVIEMBRE 1991

25 Nov 1991

PARTICIPANTES EN EL PROYECTO:

RESPONSABLE: Dr. Julio Delgado

PARTICIPANTE: Lic. Javier Menéndez

INFORME TECNICO PROYECTO "DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA CEPA QUE HIDROLICE LA LACTOSA DE LECHE Y SUERO"

Como se había informado anteriormente en una etapa inicial, después de aislar el fragmento de ADN que contiene la secuencia codificante para el gen de la lactasa de *K. fragilis*, este gen fue subclonado en un vector de expresión para la levadura *K. fragilis*.

Durante el período de entrenamiento en nuestro centro del investigador Jorge Rius proveniente del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuernavaca, México, se realizaron diferentes experimentos de transformación utilizando el vector pBLHC (Fig 1) en la cepa de *K. fragilis* utilizada como hospedero, sin lograr obtenerse colonias transformantes para este vector con ninguno de los métodos utilizados por nosotros (Electroporación y Tratamiento de las células intactas de levadura con sales de $LiClO_4$), no ocurriendo así para el vector que utilizamos como control positivo de la transformación que fue el plásmido pKRIB (Fig 2). Pensamos que este resultado negativo pueda deberse a la estructura del plásmido construido por nosotros y no al método de transformación, ya que como puede observarse en el esquema del plásmido pBLHC, la secuencia responsable para la replicación del mismo en la levadura hospedero (ori^H) se encuentra muy próxima al promotor del gen de la lactasa. Ha sido reportado recientemente en la literatura que la transcripción puede interferir en la replicación cuando la región promotora se encuentra a una distancia inferior a una kilobase del sitio responsable para la replicación. (M. Snyder et al. 1990). Otra posible explicación proviene de la no funcionalidad del vector intermedio construido por nosotros, el plásmido pKARS (Fig 3), el cual porta el gen de resistencia al antibiótico θ^{10} y la secuencia de replicación autónoma de *K. lactis*. Para comprobar esta segunda hipótesis realizamos un experimento de transformación de la levadura *K. fragilis* utilizando este plásmido y el control positivo del experimento fue nuevamente el plásmido pKRIB.

Como resultado de esta transformación obtuvimos que se observaban colonias transformantes con el control positivo no así con el vector pKARS, lo cual explica porque no fueron encontrados colonias transformantes en los experimentos de transformación iniciales con el vector de expresión (pBLHC). Nosotros no caracterizamos que tipo de mutación pudo ocurrir en este vector, que imposibilita su funcionalidad ya que en los estudios con enzimas de restricción este plásmido responde aparentemente bien al patrón de restricción esperado de acuerdo a las enzimas que se utilizaron.

En estos momentos nos encontramos trabajando en una construcción en la cual se utiliza el plásmido pKRIB como vector portador del gen de la lactasa para posteriormente realizar los trabajos de transformación en la cepa hospedera.

Por otra parte comenzamos los trabajos de mutagénesis de la cepa salvaje de *K. fragilis* con vistas a la obtención de mutantes

auxotrofos de esta levadura, los cuales no han sido reportados hasta el momento, esto facilitaría los trabajos de transformación ya que el marcador utilizado por nosotros (6418) constituye un sistema de selección bastante fuerte para la cepa nospedera, por lo que el número de transformantes que se obtiene es muy bajo comparado con los obtenidos por complementación de alguna auxotrofia. No obstante pensamos que estos trabajos de mutagénesis pueden resultar complicados debido a que *K. fragilis* es una levadura usualmente diploide.

También estamos haciendo estudios de homología, evidenciando la misma por "Southern blot", donde estamos utilizando algunos marcadores de selección ya reportados para otras especies de levaduras, lo que permitirá posteriormente utilizar estos marcadores como sonda para aislar estos genes a partir de una genoteca de *K. fragilis* en la cual también nos encontramos trabajando.

Pensamos que estos trabajos que estamos abordando van a resultar de gran utilidad con vistas a desarrollar un sistema de transformación más eficiente así como para encontrar clones transformantes de *K. fragilis* que presenten mayor expresión de la enzima beta-galactosidasa.

ANEXOS
FIGURAS

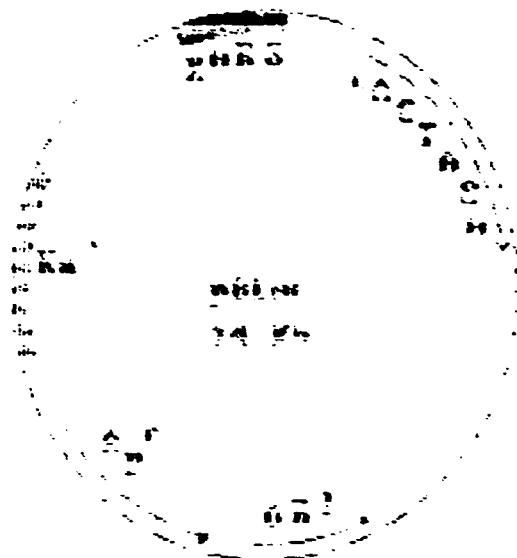


Fig. 11. Esquema de processo de transformação utilizando para transformar a whey em lactato. Se pode observar a adição de lactogênio e água na região humedecida do meio de lactose.

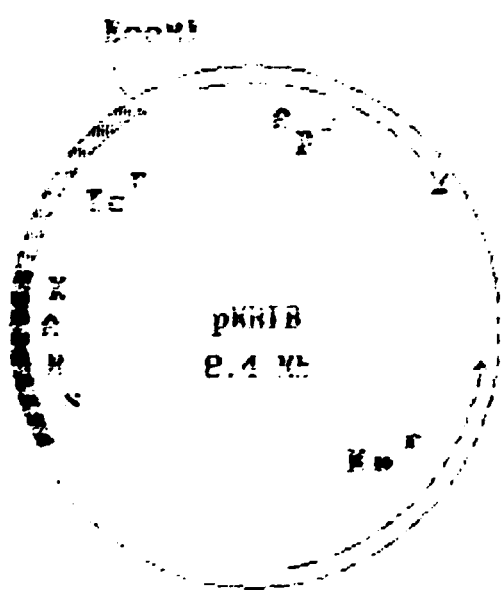


Fig. 12. Esquema de processo de transformação utilizando para transformar a whey em lactato. Se pode observar a adição de lactogênio e água na região humedecida do meio de lactose.

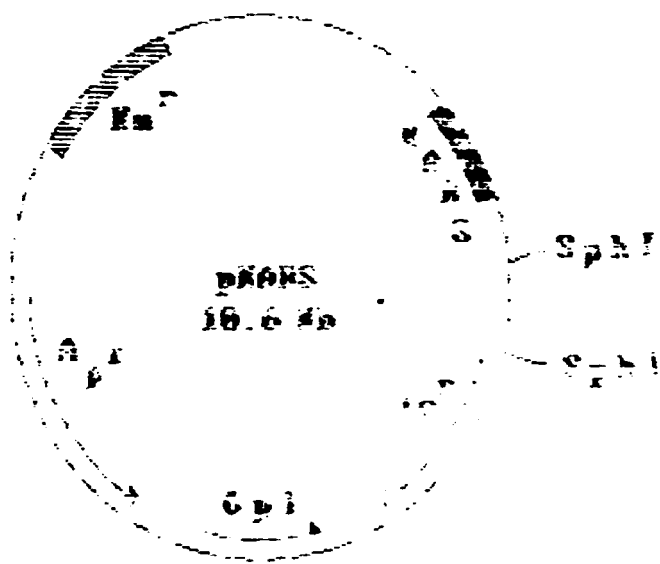


Fig 3: Esquema del vector utilizado para el clonaje del gen de la lactasa de *K. fragilis*.