

# AISLAMIENTO DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA $\beta$ - GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces fragilis*

Edenia Paifer, Javier Menéndez, Liliana Basabe, Vladimir Yong, Luis Rodríguez y Julio M. Delgado

División de Biotecnología Industrial. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado 6162, La Habana 6, C.P. 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido en febrero de 1994. Aprobado en enero de 1995.

Key words: Yeast, *Kluyveromyces fragilis*,  $\beta$ -galactosidase, *lac4*.

## SUMMARY

In this work we report on the isolation of a gene coding for  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* using recombinant DNA techniques and selecting the clones by complementation of the enzymatic activity of a mutant *lac<sup>-</sup>* *E. coli*. This gene was also expressed in a mutant *lac<sup>-</sup>* *Kluyveromyces lactis*. The analysis of restriction maps between genes coding for  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* and *Kluyveromyces lactis* demonstrated a great homology between them.

## RESUMEN

En este trabajo se reporta el aislamiento del gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y 1109 empleando las técnicas de ADN recombinante y seleccionando los clones por complementación de la actividad enzimática de una cepa mutante *lac<sup>-</sup>* de *E. coli*. Este gen también se expresó en un mutante *lac<sup>-</sup>* de *Kluyveromyces lactis*. El análisis de los mapas de restricción entre los genes codificantes para la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces lactis* demostró que existe una gran homología entre ellos.

## INTRODUCCION

La  $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.23) es una enzima que hidroliza la lactosa en sus monómeros glucosa y galactosa, al escindir el enlace  $\beta$  1-4 del azúcar. Se conoce que la leche, por su alto contenido en lactosa, no puede ser asimilada por cierto grupo de personas, pues les ocasiona trastornos digestivos a causa de que no sintetizan  $\beta$ -galactosidasa (Bayless *et al.*, 1971).

Por otra parte, en el área industrial los problemas ocasionados por la lactosa se relacionan con la utilización del suero de leche y con la manufactura de productos derivados de la leche (Holsinger, 1978), por lo tanto las razones del interés actual por esta enzima son básicamente nutricionales e industriales.

La enzima  $\beta$ -galactosidasa purificada de *K. fragilis* presenta mayor estabilidad ante variaciones de temperatura y de la concentración de iones que la enzima purificada de la especie *K. lactis* (Mahoney y

John, 1978), por lo que resultaría más conveniente utilizar la primera para la hidrólisis de la leche y productos derivados de ella en la industria alimentaria. El objetivo de este trabajo fue aislar el gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa de *K. fragilis* como un primer paso para su posterior manipulación con vistas a obtener un sistema que exprese eficientemente dicha enzima.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas y medios

La cepa de *E. coli* MC1061 ( $F^+$ , araD139, D(ara, leu)7696, DlacY74, galU, galK<sup>+</sup>, hsr<sup>-</sup>, hsm<sup>+</sup>, str<sup>+</sup>) se utilizó en todas las transformaciones bacterianas y propagaciones de plasmidios. Esta se creció a 37°C en medio LB y se añadió ampicilina (LBA) a 100  $\mu$ g/mL. Las cepas de levadura *K. fragilis* NRRL Y 1109 y *K. lactis* SD11 (*lac4<sup>-</sup>*) se crecieron a 28°C en medio YPG.

### Aislamiento de ADN cromosomal

El ADN cromosomal de las células de levadura se aisló según el procedimiento descrito por Philippsen *et al.* (1991).

### Southern-blot

Se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Sambrook *et al.* (1989).

### Transformación

El método de transformación utilizado para la cepa *K. lactis* SD11 ha sido previamente reportado (Das *et al.*, 1984).

### Construcción de la genoteca

La genoteca se realizó digiriendo el ADN de *K. fragilis* NRRL Y 1109 con la enzima MboI. Los fragmentos de talla entre 6 y 9 kb se aislaron mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión seguido por extracción fenólica. Estos fragmentos se ligaron al vector pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) digerido con BamHI y tratado con fosfatasa alcalina (CIP). La mezcla se transformó en la cepa MC1061 y se propagó en medio LBA que contenía 5-bromo-4-cloro-3-indolilo- $\beta$ -D-galactopiranosido (XGAL).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Aislamiento del gen lactasa de *K. fragilis*

Después de haber propagado 17 000 colonias de MC1061 de una genoteca de 80 000 colonias sobre medio LBA con XGAL se observó que cuatro de ellas

se colorearon de azul. Estas colonias se aislaron y sus plasmidios se purificaron. Estos plasmidios se nombraron pLACKF1-4 y contenían insertos desde 7 hasta 9 kb. Debían contener el gen lactasa de *K. fragilis* porque las células de MC1061 no pueden expresar la  $\beta$ -galactosidasa, pero sí son capaces de expresar el gen *lac4* de *K. lactis* cuando se transforman con el plasmidio pK16 (resultados no mostrados).

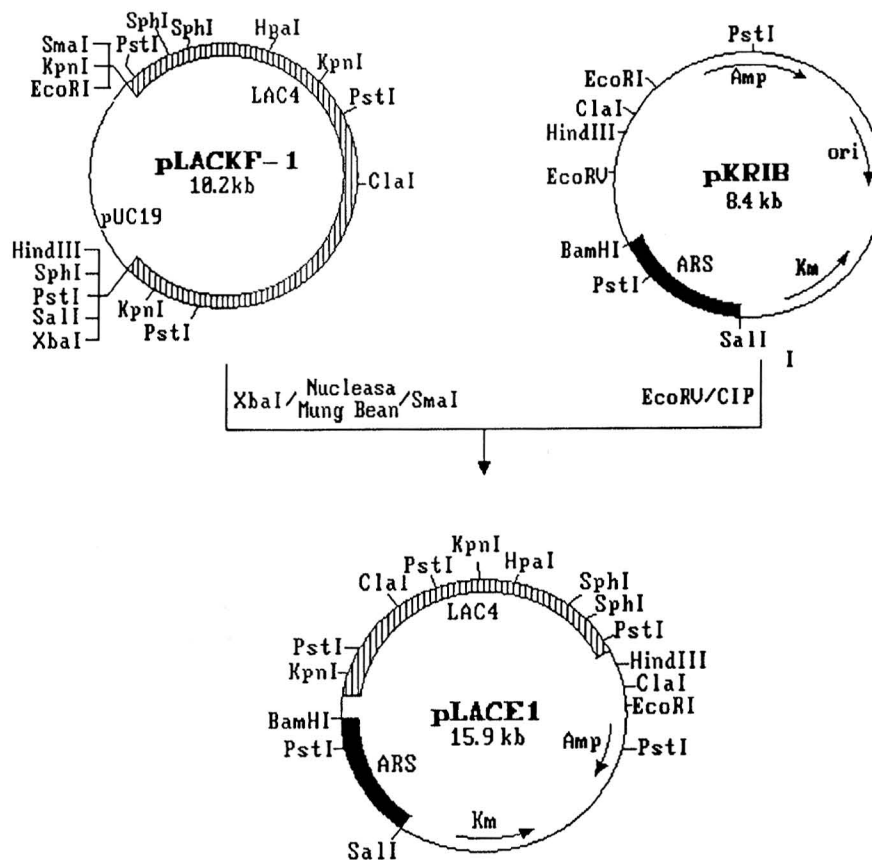
#### El gen lactasa de *K. fragilis* complementa el gen *lac4* de *K. lactis*

Un fragmento XbaI-SmaI de 7.5 kb del plasmidio pLACKF1 el cual supuestamente contiene el gen lactasa de *K. fragilis* se subclonó en el plasmidio pKRIB (Sreekrishna *et al.*, 1984) (figura 1). El plasmidio resultante pLACE se utilizó para transformar la cepa

de *K. lactis* SD11. Los transformantes seleccionados en medio YPG que contenía el antibiótico gentamicina (G418) a una concentración de 100  $\mu$ g/mL se replicaron sobre medio YPG con XGAL. Todos los transformantes se colorearon de azul, lo que evidenció que el gen de la lactasa de *K. fragilis* complementa la actividad del gen *lac4* de *K. lactis*.

#### Comparación entre los genes que codifican para la $\beta$ -galactosidasa de *K. fragilis* y *K. lactis*

El gen *lac4* de la levadura *K. lactis* fue aislado por Dickson y Markin (1978), y su secuencia nucleotídica ha sido reportada (Poch *et al.*, 1992). Con el fin de conocer la posible existencia de homología entre este gen y el gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa de *K. fragilis* NRRL Y 1109 se realizó un estudio de ho-



**Fig.1.** Southern-blot de los ADN cromosomales de las levaduras *K. fragilis* y *K. lactis* para estudiar la homología entre los genes que codifican para las  $\beta$ -galactosidasas de ambas especies. Línea 1, Banda XbaI-ClaI del plasmidio pK16 que contiene el gen *lac4* de *K. lactis*, que fue utilizada como sonda en la hibridación; líneas 2 y 3, ADN de *K. fragilis* y *K. lactis* respectivamente digeridos con la enzima XbaI; líneas 4 y 5, ADN de *K. fragilis* y *K. lactis* respectivamente digeridos con la enzima HaeII.

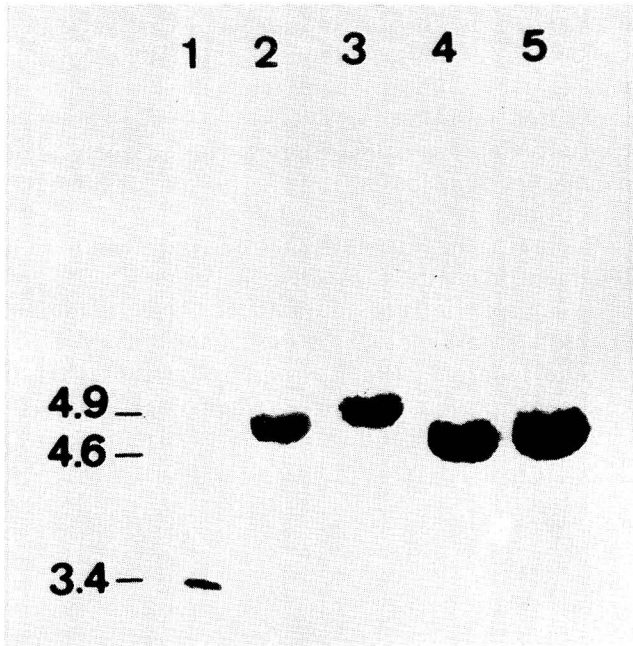


Fig. 2. Esquema de clonación del gen lactasa de *K. fragilis* en el plasmidio pKRIB para transformar la levadura *K. lactis*.

homología a nivel de ADN entre ambas cepas. Para ello se llevaron a cabo experimentos de Southern blot con los ADN de dichas cepas, digeridos con diferentes enzimas de restricción y empleando como sonda un fragmento ClaI-XbaI de aproximadamente 3.8 kb del plasmidio pK16 que contiene el gen *lac4*

de *K. lactis* (Dickson y Markin, 1978). La figura 2 muestra el resultado de uno de los southern blot realizados. En ésta se observa que existe un patrón de hibridación similar en ambas cepas para las enzimas de restricción empleadas, aunque en el caso en que el ADN genómico se digirió con XbaI (líneas 2 y 3) se observa una pequeña diferencia en la talla de las señales obtenidas para ambas especies. Estos resultados concuerdan con los trabajos recientemente publicados por Sor y Fukuhara (1989) acerca de la relación entre estas especies, los cuales clasificaron estas dos levaduras dentro de una misma especie aunque mostraron evidencias de subgrupos diferentes teniendo en cuenta el tamaño y el número de cromosomas que presentan.

La figura 3 muestra el mapa de restricción del inserto de 7,5 kb presente en el plasmidio pLACKF1 que contiene el gen lactasa de *K. fragilis*. Al comparar este mapa con el mapa de restricción obtenido a partir de la secuencia del gen *lac4* de *K. lactis* (Poch et al., 1992) puede observarse que ambos genes presentan un patrón de restricción similar. Las mínimas diferencias encontradas deben ser resultado del propio método de confección del mapa de restricción. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los experimentos de Southern blot (figura 1), lo cual constituye otra evidencia de la

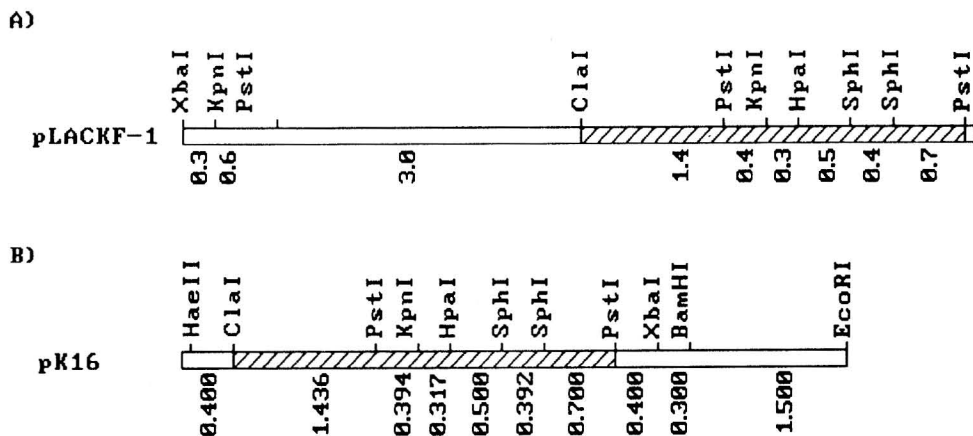


Fig. 3. Mapas de restricción de los genes lactasa de *K. fragilis* (A) y *K. lactis* (B) que demuestran la homología entre ellos. En su parte inferior se señalan las tallas de los fragmentos obtenidos al realizar el mapa de restricción. Las zonas rayadas representan la región de homología encontrada entre el fragmento de ADN genómico clonado de *K. fragilis* y el mapa de restricción del gen *lac4* de *K. lactis*.

posible homología entre los genes *lac* de ambas especies. La secuencia del nuevo gen aislado se está llevando a cabo.

## REFERENCIAS

- BAYLESS, T.M.; D.M. PAIGE and G.D. FERRY (1971). Lactose intolerance and milk drinking habits. *Gastroenterology*, **60**:605-608.
- BREUNIG, K.D.; U. DAHLEMS; S. DAS and C.P. HOLLENBERG (1984). Analysis of a eucariotic  $\beta$ -Galactosidase gene: the terminal end of the yeast *Kluyveromyces lactis* protein shows homology to the *E. coli* *lacZ* gene product. *Nucleic Acids Res.* **12**:2327-2341.
- DAS, S.; E. KELLERMANN and C.P. HOLLENBERG (1984). Transformation of *Kluyveromyces fragilis*. *J. Bacteriol.* **158**:1165-1167.
- DICKSON, R.C. and J.S. MARKIN (1978). Molecular cloning and expression in *E. coli* of a yeast gene coding for  $\beta$ -Galactosidase. *Cell* **15**:123-130.
- HOLSINGER, V.H. (1978). Applications of lactose-modified milk and whey. *Food Technol.* **32**:35-40.
- MAHONEY, R.R. and R.W. JOHN (1978). Stability and enzymatic properties of  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Biochem.* **1**:327-350.
- PHILIPPSEN, P.; A. STOTZ and C. SCHERF (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc. USA. **194**:169-171
- POCH, O.; H. L'HOTE; V. DALLERY; F. DEBEAUX; R. FLEER and R. SODOYER (1992). Sequence of the *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase: Comparison with prokariotic enzymes and secondary structure analysis. *Gene* **118**:55-63.
- SAMBROOK, J.; E.F. FRITSCH and T. MANIATIS (1989). *Molecular cloning*. 2nd. edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. USA. pp. 9.31-9.62.
- SOR, F. and H. FUKUHARA (1989). Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. *Yeast* **5**:1-10.
- SREEKRISHNA, K.; T.D. WEBSTER and R.C DICKSON (1984). *Gene* **28**:73-81.
- YANISCH-PERRON, C.; J. VIEIRA and J. MESSING (1985). *Gene* **33**:103-119.