

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO DE LA LACTOSA EN LA EXPRESIÓN DE GENES REGULADOS POR  
EL PROMOTOR *AOX1* Y GENES RELACIONADOS EN CEPAS DE *Pichia pastoris*  
MODIFICADAS PARA EMPLEAR LACTOSA COMO FUENTE DE CARBONO**

**POR**

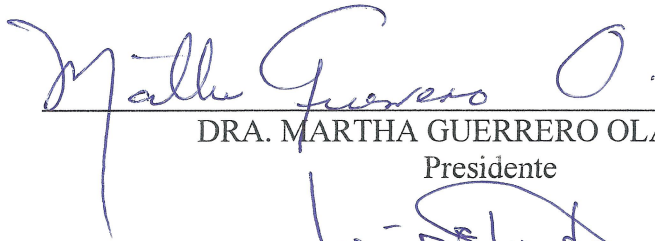
**L.B.G. MARIANA SÁNCHEZ VILLARREAL**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**NOVIEMBRE, 2019**

EFFECTO DE LA LACTOSA EN LA EXPRESIÓN DE GENES REGULADOS  
POR EL PROMOTOR *AOXI* Y GENES RELACIONADOS EN CEPAS  
DE *Pichia pastoris* MODIFICADAS PARA EMPLEAR LACTOSA  
COMO FUENTE DE CARBONO

Comité de tesis



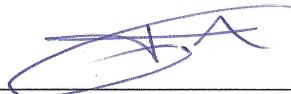
---

DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN  
Presidente



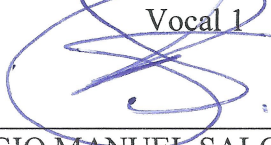
---

DR. JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ  
Secretario



---

DR. JUAN ANTONIO GALLEGOS LÓPEZ  
Vocal 1



---

DR. SERGIO MANUEL SALCEDO MARTÍNEZ  
Vocal 2



---

DRA. LUCÍA ELIZABETH CRUZ SUÁREZ  
Vocal 3

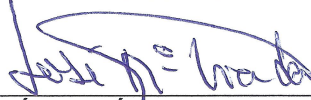
EFFECTO DE LA LACTOSA EN LA EXPRESIÓN DE GENES REGULADOS  
POR EL PROMOTOR *AOX1* Y GENES RELACIONADOS EN CEPAS  
DE *Pichia pastoris* MODIFICADAS PARA EMPLEAR LACTOSA  
COMO FUENTE DE CARBONO

Dirección de tesis



---

DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN  
Director



---

DR. JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ  
Co-director

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber brindado apoyo económico, tanto con la beca de doctorado (305611), como con los recursos para la realización del proyecto (CB-2012-183840); al igual que al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León por los recursos económicos para la realización del proyecto (CN548-15). Al Instituto de Biotecnología, a la Facultad de Ciencias Biológicas y a la UANL por proporcionar los espacios y recursos para poder llevar a cabo mis estudios de doctorado.

A los miembros de mi comisión de tesis: la Dra. Martha Guerrero Olazarán, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el proyecto de tesis en el laboratorio y asesorarme para su estructuración con sus consejos y comentarios, por el tiempo dedicado al desarrollo del proyecto y a la obtención de los recursos para que fuera posible su realización y por haber contribuido en mi formación académica y profesional; el Dr. José María Viader Salvadó, por sus consejos y comentarios, por el tiempo dedicado al desarrollo del proyecto y por haber contribuido en mi formación académica y profesional; y mis tutores, la Dra. Elizabeth Cruz Suárez y el Dr. Sergio Salcedo Martínez, por haber estado al pendiente de las evaluaciones y por el interés que mostraron en mi proyecto.

Al QBP Mauricio Castillo Galván, a la LBG Ana Lucía Herrera Estala y al LBG Francisco de Jesús Balderas Cisneros, porque gracias a sus trabajos previos fue posible estructurar este estudio. Al Dr. José Antonio Fuentes Garibay, a la LBG Ana Lucía Herrera Estala y a la MC Karla Fernández Cano por haberme apoyado y capacitado en procesos fundamentales para la parte experimental del proyecto, y a Cristina Alanís por haber apoyado en la realización de los experimentos.

A mis compañeros del laboratorio: David Gutiérrez, Ana Herrera, Alber Sánchez, Fabián Pérez, Rebeca Torres, Karla Fernández, Francisco Balderas, Cristina Alanís, Antonio Fuentes, Jonathan Huerta, Abel Caballero, Everardo Carranza, David Corro, Mauricio Castillo, Karla Soto, Ana Huerta, Lilia, Daniela, Beatriz, Nancy, Yanelis; y a todos con quienes estuve en algún momento en el L-5, por hacer del laboratorio un gran lugar para trabajar.



Agradezco especialmente a mi familia: a mis padres, Rafael Sánchez González y Leticia Villarreal Sepúlveda, porque sin ustedes no estaría donde estoy, gracias por haberme brindado siempre todo su apoyo y por impulsarme para continuar; y a mis hermanos: José, por cultivar mi paciencia, y Cristina, porque siempre me alegrabas con tu buen humor cuando ya no podía más.

A David Alejandro Gutiérrez, por todo el apoyo y comprensión que me diste cuando las cosas no salían como lo esperaba y por estar ahí cuando sí resultaban. Por tus consejos y por darme ánimos para continuar. Gracias por creer en mí.

A quien lea este trabajo, porque no dejó que se quedara olvidado.

## DEDICATORIAS

A mi familia,

que es la que siempre ha estado apoyándome a lo largo de la vida.

A mis amigos,

que son los que siempre han estado para recordar los momentos especiales.

A mis maestros,

que son los que siempre han brindado su experiencia y conocimientos.

A quienes hicieron posible este trabajo

porque para llevarlo a cabo fue necesario mucho más que pipetear, leer y escribir.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	iv
DEDICATORIAS .....	vi
ÍNDICE .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xxvii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	xxxiv
RESUMEN.....	xxxviii
ABSTRACT .....	xxxix
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Lactosa y metabolismo.....	3
2.1.1. Lactosa y lactosuero .....	3
2.1.2. $\beta$ -galactosidasa .....	4
2.1.2.1. Características de la $\beta$ -galactosidasa de <i>K. lactis</i> .....	5
2.1.2.2. Características de la $\beta$ -galactosidasa de <i>Paecilomyces aeruginus</i> .....	6
2.1.2.3. Preparaciones comerciales de $\beta$ -galactosidasa .....	6
2.1.2.4. Aplicaciones industriales de $\beta$ -galactosidasa .....	7
2.1.3. Modificaciones en levaduras para producción de $\beta$ -galactosidasa.....	8
2.1.3.1. Modificaciones en <i>S. cerevisiae</i> para producción de $\beta$ -galactosidasa .....	8
2.1.3.2. Modificaciones en <i>P. pastoris</i> para producción de $\beta$ -galactosidasa .....	10
2.2. <i>Pichia pastoris</i> .....	14
2.2.1. Características del organismo y usos en biotecnología .....	14
2.2.2. Promotores empleados en el sistema de expresión de <i>P. pastoris</i> y su regulación .....	15



6.2.2.8. Determinación de actividad específica, actividad volumétrica y rendimiento producto biomasa de $\beta$ -galactosidasa.....	32
6.2.3. Análisis de transcriptoma .....	33
6.2.3.1. Toma de muestra para el análisis de transcriptoma .....	33
6.2.3.2. Aislamiento de RNA.....	33
6.2.3.3. Análisis de la calidad de la preparación de RNA .....	34
6.2.3.4. Análisis bioinformáticos de archivos de transcriptomas para obtener datos de expresión diferencial de genes .....	37
6.2.3.5. Análisis de ontología de genes de los genes expresados diferencialmente en las tres comparaciones.....	45
6.2.3.6. Análisis de expresión diferencial de los genes implicados en el metabolismo central.....	46
6.2.3.7. Análisis de expresión diferencial de los genes implicados en el transporte de carbohidratos y en la vía de utilización del metanol.....	46
6.3. OBJETIVO 2. Evaluación del comportamiento metabólico de las cepas KM71FTEII- LAC, KM71HGH22K-LAC y sus respectivas cepas control cultivadas en lactosa, glucosa, glicerol y lactosa con metanol; y el efecto de la lactosa y el glicerol sobre la expresión de genes regulados por los promotores <i>AOXI</i> y <i>GAP</i> y dos genes del metabolismo de metanol mediante RT-qPCR. ....	47
6.3.1. Estrategia general .....	47
6.3.2. Evaluación de parámetros fisiológicos de las cepas de <i>P. pastoris</i> KM71FTEII- LAC y KM71HGH22K-LAC cultivadas en medios con lactosa, glucosa, glicerol, lactosa con metanol y metanol.....	49
6.3.3. Cultivos de inducción de genes regulados por el promotor <i>AOXI</i> .....	49
6.3.3.1. Cultivos iniciales en BMG o BMLac .....	49
6.3.3.2. Cultivo de inducción en BMM y BMM-CaCl <sub>2</sub> . ....	50
6.3.3.3. Toma de muestras .....	50
6.3.3.4. Preparación de lisados celulares .....	51
6.3.3.5. Ensayo para actividad de $\beta$ -galactosidasa .....	51
6.3.3.6. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.....	52
6.3.3.7. Determinación de la concentración de proteínas por el método de BCA .....	54

6.3.3.8. Determinación de la actividad de fitasa .....	56
6.3.3.9. Cuantificación de la concentración de hGH mediante ELISA indirecto .....	57
6.3.3.10. Análisis de proteínas por SDS-PAGE.....	60
6.3.3.11. Análisis estadístico .....	61
6.3.4. Evaluación de los niveles de expresión de genes regulados por los promotores <i>AOXI</i> y <i>GAP</i> , y de otros genes relacionados, mediante RT-qPCR .....	63
6.3.4.1. Estrategia general.....	63
6.3.4.2. Preparación de muestras de RNA .....	64
6.3.4.3. Análisis de la calidad de las muestras de RNA .....	65
6.3.4.4. Tratamiento de las preparaciones de RNA con DNasa.....	65
6.3.4.5. Síntesis de cDNA a partir de RNA (RT).....	66
6.3.4.6. Diseño experimental y oligonucleótidos empleados para qPCR.....	66
6.3.4.7. Estandarización del ensayo de qPCR.....	71
6.3.4.8. Procedimiento técnico para la realización de los ensayos de qPCR.....	71
6.3.4.9. Curvas estándar para la determinación de la eficiencia de amplificación en los ensayos de qPCR para cada uno de los genes seleccionados .....	75
6.3.4.10. Cálculo de la expresión de los genes analizados .....	76
6.4. OBJETIVO 3. Construcción de una cepa de <i>P. pastoris</i> productora de una β-galactosidasa extracelular.....	78
6.4.1. Estrategia general .....	78
6.4.2. Terminología de cepas de <i>E. coli</i> y técnicas generales empleadas en la construcción del plásmido pGAHbGalgs.....	81
6.4.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep) por el método de lisis alcalina .....	83
6.4.2.2. Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep) con el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System .....	84
6.4.2.3. Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep) con el kit PureYield Plasmid Miniprep System .....	85
6.4.2.4. Aislamiento de DNA plasmídico a mediana escala (midiprep) por el método de lisis alcalina .....	85

6.4.2.5. Purificación del DNA plasmídico mediante solventes orgánicos .....	86
6.4.2.6. Purificación del DNA plasmídico con columnas de sílice.....	87
6.4.2.7. Purificación del DNA plasmídico por filtración .....	87
6.4.2.8. Electroforesis en geles de agarosa tratados para disminuir la degradación del DNA .....	88
6.4.2.9. Purificación de DNA a partir de bandas de electroforesis en gel de agarosa mediante centrifugación con filtro de algodón .....	89
6.4.2.10. Purificación de DNA a partir de bandas de electroforesis en gel de agarosa mediante unión a columnas de sílice.....	90
6.4.2.11. Preparación de células de <i>E. coli</i> TOP10 calciocompetentes.....	91
6.4.2.12. Transformación de <i>E. coli</i> TOP10.....	91
6.4.2.13. Conservación de cepas de <i>E. coli</i> .....	92
6.4.3. Obtención de la secuencia sintética de la $\beta$ -galactosidasa extracelular a producir en <i>P. pastoris</i> .....	92
6.4.3.1. Elección de la secuencia de la $\beta$ -galactosidasa extracelular a producir en <i>P. pastoris</i> .....	92
6.4.3.2. Diseño de la secuencia sintética de la $\beta$ -galactosidasa extracelular a producir en <i>P. pastoris</i> .....	93
6.4.3.3. Manejo y conservación en cepas de <i>E. coli</i> de la secuencia sintética codificante para $\beta$ -galactosidasa de <i>P. aeruginosa</i> .....	94
6.4.4. Primera construcción del plásmido pGAHbGalgs .....	95
6.4.4.1. Aislamiento de plásmidos pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII a mediana escala.....	96
6.4.4.2. Caracterización de los vectores pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII por análisis con enzimas de restricción I.....	97
6.4.4.3. Reacciones de restricción a escala preparativa de los plásmidos pCC1-b-GalgsE y pGAHbGalgs con XhoI y NotI para purificación de bandas de inserto y vector (I).....	98
6.4.4.4. Ligación I del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la primera construcción (Fallida).....	98
6.4.4.5. Reacciones de restricción a escala preparativa de los plásmidos pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII con XhoI y NotI para purificación de bandas de inserto y vector (II).....	99
6.4.4.6. Reacción de restricción a escala preparativa del plásmido pCC1-b-GalgsE con XhoI y NotI para purificación de bandas de inserto (III).....	100
6.4.4.7. Ligación II del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la primera construcción.....	100
6.4.4.8. Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 calciocompetente con la primera construcción de pGAHbGalgs (reacción de ligación II).....	101

6.4.4.9. Caracterización por PCR de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con el plásmido pGAHbGalgs de la primera construcción .....	101
6.4.4.10. Obtención del plásmido pGAHbGalgs (primera construcción) linealizado para la transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 .....	104
6.4.4.11. Transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 con el plásmido pGAHbGalgs de la primera construcción .....	106
6.4.4.12. Caracterización de cepas de <i>P. pastoris</i> pGAHbGalgs de la primera construcción por PCR directo .....	108
6.4.4.13. Caracterización fenotípica por ensayo de $\beta$ -galactosidasa.....	109
<b>6.4.5. Segunda construcción del plásmido pGAHbGalgs .....</b>	<b>110</b>
6.4.5.1. Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 a partir de pCC1-b-GalgsL liofilizado.....	110
6.4.5.2. Caracterización del plásmido pCC1-b-GalgsL por análisis de restricción .....	111
6.4.5.3. Aislamiento de plásmido pCC1-b-GalgsL a mediana escala.....	111
6.4.5.4. Reacción de restricción a escala preparativa del plásmido pCC1-b-GalgsL con XhoI y NotI para purificación de banda de inserto.....	112
6.4.5.5. Ligación del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la segunda construcción.....	113
6.4.5.6. Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 calciocompetente con la segunda construcción de pGAHbGalgs.....	114
6.4.5.7. Caracterización por PCR de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con el plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción.....	114
6.4.5.8. Obtención del plásmido pGAHbGalgs (segunda construcción) linealizado para la transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 .....	116
6.4.5.9. Transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 con el plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción .....	118
6.4.5.10. Caracterización fenotípica de <i>P. pastoris</i> KM71bGalgs de la segunda transformación.....	119
6.4.5.11. Caracterización de cepas de <i>P. pastoris</i> pGAHbGalgs de la segunda construcción por PCR .....	119
<b>6.4.6. Caracterizaciones por análisis de restricción de los plásmidos pCC1-b-Galgs y pGAHbGalgs empleados o derivados de la primera y segunda construcciones .....</b>	<b>121</b>
6.4.6.1. Electroforesis en gel de agarosa con post-tinción .....	123



6.4.7. Tercera construcción del plásmido pGAHbGalgs .....	123
6.4.7.1. Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 a partir de pCC1-b-GalgsL liofilizado, con incubación a temperatura ambiente .....	124
6.4.7.2. Caracterización con HindIII de pCC1-b-GalgsL.....	125
6.4.7.3. Reacción de restricción a escala preparativa del plásmido pCC1-b-GalgsL con XhoI y NotI para purificación de banda de inserto.....	126
6.4.7.4. Ligación del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la tercera construcción .....	127
6.4.7.5. Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 calciocompetente con la tercera construcción de pGAHbGalgs.....	127
6.4.7.6. Caracterización por análisis de restricción de los plásmidos extraídos de colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con la ligación pGAHbGalgs de la tercera construcción (I).....	128
6.4.7.7. Caracterización por PCR de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con el plásmido pGAHbGalgs de la tercera construcción.....	129
6.4.7.8. Preparación de conjuntos de colonias transformantes de la tercera construcción del plásmido pGAHbGalgs y caracterización por PCR .....	131
6.4.7.9. Caracterización por análisis de restricción de los plásmidos extraídos de colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con la ligación pGAHbGalgs de la tercera construcción (II).....	132
6.4.7.10. Caracterización mediante PCR de los plásmidos de las colonias de las tres construcciones .....	132
7. RESULTADOS.....	134
7.1. OBJETIVO 1. Evaluación del comportamiento metabólico y análisis de los perfiles transcripcionales de las cepas KM71LAC412 y una cepa control cultivadas en lactosa, glucosa, glicerol y lactosa con metanol.....	134
7.1.1. Determinación de parámetros fisiológicos de la cepa KM71LAC412 y una cepa control en diferentes fuentes de carbono .....	134
7.1.1.1. Determinación de velocidad de crecimiento específico, rendimiento de biomasa por unidad de sustrato y velocidad específica de consumo de sustrato .....	134
7.1.1.2. Determinación de actividad específica de $\beta$ -galactosidasa .....	139
7.1.2. Análisis de transcriptoma de las cepas KM71LAC412 y una cepa control en diferentes fuentes de carbono.....	141
7.1.2.1. Medición de parámetros fisiológicos de los cultivos empleados para la toma de muestra...	141

7.1.2.2. Validación de archivos y modificación de la anotación de referencia .....	141
7.1.2.3. Comparación de la expresión diferencial de genes entre cepas y fuentes de carbono .....	142
7.2. OBJETIVO 2. Evaluación del comportamiento metabólico de las cepas KM71FTEII-LAC, KM71HGH22K-LAC y sus respectivas cepas control cultivadas en lactosa y otras fuentes de carbono y el efecto de estas fuentes de carbono sobre la regulación de los promotores <i>AOXI</i> y <i>GAP</i> mediante RT-qPCR. ....	154
7.2.1. Evaluación del efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y el rendimiento de biomasa por sustrato de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC .....	154
7.2.2. Evaluación del efecto de la fuente de carbono en la expresión de genes regulados por el promotor <i>AOXI</i> en cultivos en metanol.....	159
7.2.2.1. Rendimientos de biomasa por unidad de sustrato .....	160
7.2.2.2. Rendimiento de proteína intracelular producida por unidad de biomasa .....	163
7.2.2.3. Actividad y rendimiento de $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa .....	164
7.2.2.4. Rendimiento de proteínas extracelulares totales y FTEII en sobrenadante de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII.....	168
7.2.2.5. Rendimientos de proteínas extracelulares totales y hGH en sobrenadante de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K.....	173
7.2.2.6. Análisis por SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivos de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC.....	179
7.2.3. Evaluación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de genes regulados por los promotores <i>AOXI</i> y <i>GAP</i> , y de otros genes relacionados.....	180
7.2.3.1. Muestras empleadas en la evaluación .....	180
7.2.3.2. Verificación de oligonucleótidos diseñados para qPCR de la región <i>aoxI::ARG4</i> .....	180
7.2.3.3. Niveles transcripcionales de los genes evaluados .....	181
7.2.3.4. Proporción de niveles transcripcionales de genes evaluados a diferentes tiempos de inducción.....	193
7.2.3.5. Cuantificación absoluta.....	194
7.2.4. Correlación entre el rendimiento de producto/biomasa y el nivel de expresión relativa de FTEII y hGH .....	198

7.3. OBJETIVO 3. Construcción de una cepa de <i>P. pastoris</i> productora de una $\beta$ -galactosidasa extracelular.....	199
7.3.1. Obtención de la secuencia sintética de la $\beta$ -galactosidasa extracelular a producir en <i>P. pastoris</i> .....	199
7.3.1.1. Elección de la secuencia de la $\beta$ -galactosidasa extracelular a producir en <i>P. pastoris</i> .....	199
7.3.1.2. Diseño de la secuencia sintética de la $\beta$ -galactosidasa extracelular a producir en <i>P. pastoris</i> .....	200
7.3.1.3. Manejo y conservación en cepas de <i>E. coli</i> de la secuencia sintética codificante para $\beta$ -galactosidasa de <i>P. aeruginosa</i> .....	201
7.3.2. Primera construcción del plásmido pGAHbGalgs .....	201
7.3.2.1. Aislamiento de plásmidos pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII a mediana escala .....	201
7.3.2.2. Caracterización de los vectores pCC1-b-Galgs y pGAHFTEII por análisis con enzimas de restricción I .....	202
7.3.2.3. Purificación de bandas de inserto y vector I .....	203
7.3.2.4. Purificación de bandas de inserto y vector II .....	204
7.3.2.5. Purificación de bandas de inserto (III) y ligación II del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la primera construcción .....	206
7.3.2.6. Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 calciocompetente con la primera construcción de pGAHbGalgs (reacción de ligación II) y caracterización de las colonias obtenidas por PCR.....	207
7.3.2.7. Obtención del plásmido pGAHbGalgs (primera construcción) linealizado para la transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 .....	209
7.3.2.8. Obtención de <i>P. pastoris</i> KM71bGalgs de la primera construcción y caracterización por PCR .....	212
7.3.3. Segunda construcción del plásmido pGAHbGalgs .....	215
7.3.3.1. Caracterización del plásmido pCC1-b-GalgsL por análisis de restricción .....	215
7.3.3.2. Aislamiento de plásmido pCC1-b-GalgsL a mediana escala .....	216
7.3.3.3. Purificación de bandas de inserto y ligación del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la segunda construcción .....	217
7.3.3.4. Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 calciocompetente con la segunda construcción de pGAHbGalgs y caracterización de las colonias obtenidas por PCR.....	219

7.3.3.5. Obtención del plásmido pGAHbGalgs (segunda construcción) linealizado para la transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 .....	222
7.3.3.6. Transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 con el plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción .....	225
7.3.3.7. Caracterización fenotípica de clonas de <i>P. pastoris</i> KM71 transformadas con pGAHbGalgs de la segunda construcción .....	225
7.3.3.8. Caracterización por PCR de clonas de <i>P. pastoris</i> KM71 transformadas con pGAHbGalgs de la segunda construcción.....	226
7.3.4. Caracterizaciones por análisis de restricción de los plásmidos pCC1-b-Galgs y pGAHbGalgs empleados o derivados de la primera y segunda construcciones .....	227
7.3.5. Tercera construcción del plásmido pGAHbGalgs .....	233
7.3.5.1. Caracterización con HindIII de pCC1-b-GalgsL.....	233
7.3.5.2. Purificación de bandas de inserto y ligación del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la tercera construcción.....	235
7.3.5.3. Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 calciocompetente con la tercera construcción de pGAHbGalgs.....	238
7.3.5.4. Caracterización por análisis de restricción de los plásmidos extraídos de colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con la ligación pGAHbGalgs de la tercera construcción (I).....	238
7.3.5.5. Caracterización por PCR de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con el plásmido pGAHbGalgs de la tercera construcción.....	240
7.3.5.6. Caracterización por análisis de restricción de los plásmidos extraídos de colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con la ligación pGAHbGalgs de la tercera construcción (II).....	242
7.3.5.7. Caracterización mediante PCR de los plásmidos de las colonias de las tres construcciones	243
8. DISCUSIÓN .....	247
8.1. Introducción .....	247
8.2. OBJETIVO 1. Evaluación de comportamiento metabólico y análisis de los perfiles transcripcionales de las cepas KM71LAC412 y una cepa control cultivadas en lactosa, glucosa y glicerol.....	249
8.2.1. Introducción.....	249

8.2.2. Parámetros fisiológicos de las cepas KM71LAC412 y una cepa control en diferentes fuentes de carbono.....	251
8.2.2.1. Velocidad de crecimiento específico, rendimiento de biomasa por unidad de sustrato y velocidad de consumo específico de sustrato .....	251
8.2.2.2. Efecto de la fuente de carbono y la fase de crecimiento en la actividad de las proteínas heterólogas necesarias para el metabolismo de lactosa: lactosa permeasa y $\beta$ -galactosidasa .....	256
8.2.2.3. Relación entre el consumo de lactosa y el crecimiento de KM71LAC412 .....	258
8.2.3. Análisis de transcriptoma de las cepas KM71LAC412 y una cepa control en diferentes fuentes de carbono.....	260
8.2.3.1. Comparación de la expresión diferencial entre cepas y fuentes de carbono.....	260
8.2.3.2. Regulación de las vías del metabolismo central .....	260
8.2.3.3. Estado de los transportadores de carbohidratos .....	261
8.2.3.4. Estado de los genes del metabolismo de metanol.....	263
8.2.3.5. Expresión diferencial de los genes <i>LAC4</i> y <i>LAC12</i> .....	264
8.2.3.6. Estado transcripcional del gen homólogo de un factor transcripcional activado por galactosa ( <i>GAL4</i> ) de <i>S. cerevisiae</i> .....	266
8.2.4. Explicación del comportamiento de crecimiento en lactosa de <i>P. pastoris</i> KM71LAC412 .....	268
8.2.5. Resumen de resultados .....	270
8.3. OBJETIVO 2. Evaluación del comportamiento metabólico de las cepas KM71FTEII-LAC, KM71HGH22K-LAC y sus respectivas cepas control cultivadas en lactosa y otras fuentes de carbono y el efecto de estas fuentes de carbono sobre la regulación de los promotores <i>AOX1</i> y <i>GAP</i> mediante RT-qPCR. ....	271
8.3.1. Evaluación del efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y el rendimiento de biomasa por sustrato de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC .....	271
8.3.2. Efecto de la fuente de carbono en la expresión de genes regulados por el promotor <i>AOX1</i> en cultivos en metanol.....	275
8.3.2.1. Rendimientos de biomasa por sustrato y de proteína intracelular por biomasa .....	275

8.3.2.2. Actividad y rendimiento de $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa .....	277
8.3.2.3. Rendimientos de proteína extracelular por biomasa.....	278
8.3.2.4. Rendimientos de proteína heteróloga regulada por $P_{AOXI}$ .....	279
8.3.3. Análisis por RT-qPCR.....	283
8.3.3.1. Genes normalizadores .....	283
8.3.3.2. Genes regulados por el promotor $GAP$ .....	283
8.3.3.3. Genes regulados por el promotor $AOXI$ y genes de la vía de utilización del metanol.....	286
8.3.4. Resumen de resultados .....	289
8.4. OBJETIVO 3. Construcción de una cepa de <i>P. pastoris</i> productora de una $\beta$ -galactosidasa extracelular.....	291
8.4.1. Recapitulación y posibles causas del fallo de los intentos de construcción ....	291
8.4.2. Posibles causas de la mutación.....	296
8.5. Conclusión.....	297
9. CONCLUSIONES .....	299
10. PERSPECTIVAS .....	301
ANEXO 1. SOLUCIONES Y REACTIVOS .....	303
ANEXO 2. SECUENCIAS NUEVAS.....	311
ANEXO 3. DATOS ADICIONALES (CULTIVOS DE INDUCCIÓN) .....	325
ANEXO 4. INFORMACIÓN DE MUESTRAS EMPLEADAS EN RT-qPCR .....	329
ANEXO 5. DATOS DE RT-qPCR.....	331
BIBLIOGRAFÍA.....	343
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO .....	355

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Preparaciones de $\beta$ -galactosidasas disponibles comercialmente. ....	7
<b>Tabla 2.</b> $\beta$ -galactosidasas expresadas heterológamente en <i>P. pastoris</i> . ....	11
<b>Tabla 3.</b> Preparación de estándares para recta de calibración de lactosa. ....	31
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos empleados en la verificación de la región <i>aox1::ARG4</i> por PCR .....	39
<b>Tabla 5.</b> Volúmenes de reactivos para PCR para verificación de la región <i>aox1::ARG4</i> . .....	40
<b>Tabla 6.</b> Programa de termociclador para PCR de verificación de región <i>aox1::ARG4</i> . ....	40
<b>Tabla 7.</b> Parámetros empleados en FASTQ Groomer. ....	41
<b>Tabla 8.</b> Parámetros empleados en FASTQ Quality Trimmer. ....	41
<b>Tabla 9.</b> Parámetros empleados en TopHat2. ....	42
<b>Tabla 10.</b> Parámetros empleados en Cufflinks. ....	43
<b>Tabla 11.</b> Parámetros empleados en Cuffcompare. ....	43
<b>Tabla 12.</b> Parámetros empleados en Cuffdiff. ....	44
<b>Tabla 13.</b> Concentración y preparación de los estándares de ASB para la recta de calibración de determinación de proteínas por el método de Bradford. ....	53
<b>Tabla 14.</b> Concentración de los estándares de ASB para la recta de calibración de determinación de proteínas por el método de BCA. ....	55
<b>Tabla 15.</b> Volúmenes para la preparación de los estándares para la recta de calibración. .....	56
<b>Tabla 16.</b> Controles del ensayo de ELISA. ....	58
<b>Tabla 17.</b> Volúmenes para la preparación de los geles de poliacrilamida. ....	60
<b>Tabla 18.</b> Diseños experimentales para la comparación de los datos obtenidos de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII. ....	62
<b>Tabla 19.</b> Condiciones de cultivo de las cepas productoras de FTEII. ....	62
<b>Tabla 20.</b> Diseños experimentales para la comparación de los datos obtenidos de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K. ....	63
<b>Tabla 21.</b> Condiciones de cultivo de las cepas productoras de hGH. ....	63
<b>Tabla 22.</b> Oligonucleótidos y sondas empleados en los ensayos de qPCR. ....	67

<b>Tabla 23.</b> Parámetros para el diseño de oligonucleótidos específicos para qPCR en Primer 3.....	68
<b>Tabla 24.</b> Volúmenes de reactivos para PCR para verificación de oligonucleótidos para qPCR de <i>aox1::ARG4</i> .....	70
<b>Tabla 25.</b> Programa de termociclador empleado en la PCR para verificación de oligonucleótidos para qPCR de <i>aox1::ARG4</i> .....	70
<b>Tabla 26.</b> Mezcla de trabajo utilizada para el volumen de una sola reacción en el ensayo de qPCR con SYBR Green para muestras de cDNA.....	72
<b>Tabla 27.</b> Mezcla de trabajo utilizada para el volumen de una sola reacción en el ensayo de qPCR con SYBR Green para controles negativos de la RT y de qPCR.....	72
<b>Tabla 28.</b> Mezcla de trabajo utilizada para el volumen de una sola reacción en el ensayo de qPCR con sondas de hidrólisis para muestras de cDNA.....	73
<b>Tabla 29.</b> Mezcla de trabajo utilizada para el volumen de una sola reacción en el ensayo de qPCR con sondas de hidrólisis para el control negativo de qPCR.....	74
<b>Tabla 30.</b> Programa del termociclador para el ensayo de qPCR con oligonucleótidos y SYBR Green.....	74
<b>Tabla 31.</b> Programa del termociclador para el ensayo de qPCR con sondas de hidrólisis.....	75
<b>Tabla 32.</b> Descripción de las variables de la <b>Ecuación 6</b> .....	76
<b>Tabla 33.</b> Parámetros empleados en los cálculos de expresión de los genes analizados.....	78
<b>Tabla 34.</b> Mezcla de reactivos para los análisis con enzimas de restricción de los plásmidos pCC1-b-Galgs y pGAHFTEII.....	97
<b>Tabla 35.</b> Mezcla de reacción para la digestión preparativa I con XhoI y NotI de la primera construcción.....	98
<b>Tabla 36.</b> Reacción de ligación I de la primera construcción.....	99
<b>Tabla 37.</b> Mezcla de reacción para la digestión preparativa II con XhoI y NotI de la primera construcción.....	100
<b>Tabla 38.</b> Mezcla de reacción para la digestión preparativa III con XhoI y NotI de la primera construcción.....	100
<b>Tabla 39.</b> Reacción de ligación II de la primera construcción.....	101



<b>Tabla 40.</b> Volúmenes de reactivos para PCR para caracterización de plásmido de colonias de <i>E. coli</i> TOP10 de la transformación de la primera construcción.....	103
<b>Tabla 41.</b> Programa de termociclador empleado en la PCR para caracterización con oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS. ....	103
<b>Tabla 42.</b> Mezcla de reactivos para los análisis con enzimas de restricción del plásmido pGAHbGalgs.....	104
<b>Tabla 43.</b> Mezclas para las reacciones de restricción a escala preparativa con la enzima Sall de pGAHbGalgs de la primera construcción. ....	105
<b>Tabla 44.</b> Parámetros de electroporación empleados en la transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 con el vector pGAHbGalgs linealizado con Sall. ....	107
<b>Tabla 45.</b> Volúmenes de siembra de las células electroporadas. ....	108
<b>Tabla 46.</b> Volúmenes de reactivos para PCR para caracterización de clonas de <i>P. pastoris</i> KM71 pGAHbGalgs .....	109
<b>Tabla 47.</b> Preparación de reacciones para caracterización con enzimas de restricción del plásmido pCC1-b-Galgs.....	111
<b>Tabla 48.</b> Volúmenes de reactivos para la digestión preparativa de pCC1-b-Galgs.....	112
<b>Tabla 49.</b> Volúmenes de reacción para la ligación del segundo intento de construcción del plásmido. ....	114
<b>Tabla 50.</b> Volúmenes de reactivos para PCR para caracterización de plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción de colonias transformantes de <i>E. coli</i> TOP10. ....	115
<b>Tabla 51.</b> Mezcla de reacción para digestiones analíticas de pGAHbGalgs de la segunda construcción con Sall. ....	117
<b>Tabla 52.</b> Mezcla de reacción para digestión preparativa de pGAHbGalgs de la segunda construcción con Sall. ....	118
<b>Tabla 53.</b> Mezcla de reacción para caracterización por PCR de la cepa de <i>P. pastoris</i> KM71 pGAHbGalgs de la segunda construcción. ....	120
<b>Tabla 54.</b> Volúmenes de reactivos para las mezclas de reacción empleadas en la caracterización por análisis de restricción con BglII de los plásmidos pGAHbGalgs y pGAHFTEII. ....	121

<b>Tabla 55.</b> Volúmenes de reactivos para las mezclas de reacción empleadas en la caracterización mediante enzimas de restricción de los plásmidos pGAHbGalgs y pGAHFTEII. ....	122
<b>Tabla 56.</b> Mezcla de reacción para caracterización del plásmido pCC1-b-GalgsL con HindIII.....	126
<b>Tabla 57.</b> Volúmenes de reactivos para la digestión preparativa de pCC1-b-Galgs en la tercera construcción. ....	126
<b>Tabla 58.</b> Mezcla de reacción para la ligación de la tercera construcción. ....	127
<b>Tabla 59.</b> Volúmenes de reacción para análisis de restricción con BglII. ....	129
<b>Tabla 60.</b> Mezclas de reacción para PCR de plásmidos resultantes de la tercera construcción. ....	130
<b>Tabla 61.</b> Programa de termociclador empleado para PCR con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS, 5BGALGS y 3BGALGS, pGAPF y 3AOX, y FTE1 y FTE2.....	130
<b>Tabla 62.</b> Mezcla de reacción para PCR de conjuntos de colonias resultantes de la tercera construcción. ....	131
<b>Tabla 63.</b> Programa de termociclador para PCR de colonia con los oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS.....	132
<b>Tabla 64.</b> Volúmenes de reacción para análisis de restricción con BglII. ....	132
<b>Tabla 65.</b> Mezcla de reacción para PCR para caracterización de plásmidos pGAHbGalgs de las tres construcciones.....	133
<b>Tabla 66.</b> Programa de termociclador para PCR con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS, 5BGALGS y 3BGALGS, pGAPF y 3AOX, y 5BGALGS y 3AOX. ....	133
<b>Tabla 67.</b> Velocidad específica de crecimiento y rendimientos de biomasa/sustrato de las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9 en BMLac, BMGlc y BMGly. ....	136
<b>Tabla 68.</b> Datos para el cálculo del consumo específico de lactosa de la cepa KM71LAC412 cultivada en BMLac.....	139
<b>Tabla 69.</b> Actividad específica, actividad volumétrica y rendimiento producto/biomasa de $\beta$ -galactosidasa promedio de la cepa KM71LAC412 en distintos medios de cultivo a diferentes tiempos. ....	140

<b>Tabla 70.</b> Densidad óptica a las 30 h de los cultivos empleados en la obtención de la muestra para RNA-Seq. ....	141
<b>Tabla 71.</b> Términos GO sobrerrepresentados entre los genes expresados diferencialmente de las comparaciones.....	144
<b>Tabla 72.</b> Niveles de expresión y expresión diferencial de genes de transportadores PpHXT1, PpHXT2 y PpHGT1 en los análisis de transcriptoma. ....	151
<b>Tabla 73.</b> Niveles de expresión y expresión diferencial de los genes regulados por el promotor <i>GAP</i> en los análisis de transcriptoma. ....	153
<b>Tabla 74.</b> Niveles de expresión y expresión diferencial del gen <i>PpATT1</i> en los análisis de transcriptoma.....	153
<b>Tabla 75.</b> Velocidad específica de crecimiento y rendimientos de biomasa/sustrato de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-Lac en BMLac, BMGlc, BMGly, BMLacMet y BMM. ....	157
<b>Tabla 76.</b> Incremento de densidad celular de las 0 a las 48 h de inducción, en DO <sub>600 nm</sub> y en g/L. ....	160
<b>Tabla 77.</b> Rendimiento de biomasa por sustrato al finalizar la fase de generación de biomasa, en gDCW/g y gDCW/mol.....	161
<b>Tabla 78.</b> Rendimiento de biomasa por sustrato a las 24 y 48 h de la fase de inducción con metanol, en gDCW/g y gDCW/mol. ....	162
<b>Tabla 79.</b> Rendimiento de proteína intracelular producida por unidad de biomasa a 0, 24 y 48 h de inducción. ....	163
<b>Tabla 80.</b> Actividad de $\beta$ -galactosidasa (U/mg proteína) a las 0, 24 y 48 h de inducción. ....	165
<b>Tabla 81.</b> Rendimiento de $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa (U/mgDCW) a las 0, 24 y 48 h de inducción. ....	166
<b>Tabla 82.</b> Rendimiento de proteínas extracelulares producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 24 y 48 h de inducción, determinadas por el método de Bradford.....	168
<b>Tabla 83.</b> Rendimiento de FTEII por unidad de biomasa de KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 24 y 48 h de inducción.....	170

<b>Tabla 84.</b> Análisis estadísticos de los rendimientos de proteínas extracelulares totales y FTEII en sobrenadante de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII. ....	172
<b>Tabla 85.</b> Rendimiento de proteínas extracelulares producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción, determinado por el método de Bradford. ....	173
<b>Tabla 86.</b> Rendimiento de proteínas extracelulares producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción, determinado por el método BCA. ....	175
<b>Tabla 87.</b> Rendimiento de hGH por unidad de biomasa de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción. ....	176
<b>Tabla 88.</b> Análisis estadísticos de las concentraciones y rendimientos de proteínas extracelulares totales y hGH en sobrenadante de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K. ....	178
<b>Tabla 89.</b> Distribución de las muestras de proteínas y cantidad aplicada en el análisis de sobrenadantes de las 48 h de inducción por SDS-PAGE. ....	179
<b>Tabla 90.</b> Número de muestras de cDNA obtenidas por cada condición de análisis. ....	180
<b>Tabla 91.</b> Parámetros de la $\beta$ -galactosidasa elegida. ....	200
<b>Tabla 92.</b> Cuantificación de las muestras de DNA plasmídico pGAHbGalgs de la primera construcción a mediana escala después del tratamiento con RNasa y la reextracción. ....	210
<b>Tabla 93.</b> Cuantificación de las digestiones preparativas de pGAHbGalgs de la primera construcción con Sall. ....	212
<b>Tabla 94.</b> Resultados teóricos de la caracterización con enzimas de restricción del plásmido pCC1-b-Galgs. ....	216
<b>Tabla 95.</b> Cuantificación de muestras de mediana escala de pCC1-b-GalgsL en la segunda construcción. ....	217
<b>Tabla 96.</b> Cuantificación de muestras reextraídas de mediana escala de pGAHbGalgs de la segunda construcción. ....	223
<b>Tabla 97.</b> Cuantificación de pGAHbGalgs de la segunda construcción linealizado con Sall y concentrado. ....	224
<b>Tabla 98.</b> Cuantificación de plásmidos extraídos de colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con la ligación pGAHbGalgs de la tercera construcción. ....	238

<b>Tabla 99.</b> Resumen de las caracterizaciones mediante análisis de restricción de los plásmidos pCC1-b-GalgsE, pGAHbGalgs y pGAHFTEII, empleados u obtenidos durante los tres intentos de construcción. ....	245
<b>Tabla 100.</b> Caracterización por PCR de los plásmidos pGAHbGalgs resultantes de los tres intentos de construcción, y de las reacciones de ligación de las cuales derivaron. .	246
<b>Tabla 101.</b> Diferencias entre los $P_{GAP}$ de distintos orígenes. ....	315
<b>Tabla 102.</b> Densidad celular de los cultivos ( $DO_{600\text{nm}}$ ) al finalizar el cultivo de generación de biomasa y a 0, 24 y 48 h de inducción con metanol.....	325
<b>Tabla 103.</b> Densidad celular de los cultivos (gDCW/L) al finalizar el cultivo de generación de biomasa y a 0, 24 y 48 h de inducción con metanol. ....	325
<b>Tabla 104.</b> Concentración de proteínas extracelulares totales producidas por las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 0, 24 y 48 h de inducción, determinada por el método de Bradford.....	326
<b>Tabla 105.</b> Concentración de proteínas extracelulares totales producidas por las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 0, 24 y 48 h de inducción, determinadas por el método de BCA.....	326
<b>Tabla 106.</b> Rendimiento de proteínas extracelulares producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 24 y 48 h de inducción, determinadas por el método de BCA.....	327
<b>Tabla 107.</b> Actividad de FTEII en sobrenadante de los cultivos de KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 0, 24 y 48 h de inducción.....	327
<b>Tabla 108.</b> Concentración de proteínas extracelulares totales en sobrenadante producidas por las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción, determinadas por los métodos de Bradford y BCA .....	328
<b>Tabla 109.</b> Concentración de hGH en sobrenadante producida por las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción, determinada por ELISA. ....	328
<b>Tabla 110.</b> Concentración, relación $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ de las muestras de RNA utilizadas en los ensayos de RT-qPCR.....	329
<b>Tabla 111.</b> Información sobre el procesamiento y análisis de las muestras de RNA utilizadas en los ensayos de RT-qPCR.....	330

<b>Tabla 112.</b> Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis del gen <i>G6PD</i> de las muestras de cultivos de inducción. ....	331
<b>Tabla 113.</b> Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis del gen <i>YPT1</i> de las muestras de cultivos de inducción. ....	332
<b>Tabla 114.</b> Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis del gen <i>GAP</i> de las muestras de cultivos de inducción.....	333
<b>Tabla 115.</b> Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis del gen <i>LAC4</i> de las muestras de cultivos de inducción. ....	334
<b>Tabla 116.</b> Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ) del análisis del gen <i>aox1::ARG4</i> de las muestras de cultivos de inducción.....	335
<b>Tabla 117.</b> Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis de los genes heterólogos regulados por $P_{AOX1}$ , <i>FTEII</i> y <i>HGH</i> , de las muestras de cultivos de inducción. ....	336
<b>Tabla 118.</b> Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis del gen <i>AOX2</i> de las muestras de cultivos de inducción. ....	337
<b>Tabla 119.</b> Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis del gen <i>DAS</i> de las muestras de cultivos de inducción.....	338
<b>Tabla 120.</b> Niveles transcripcionales de los genes analizados, normalizados respecto a la muestra calibradora y al gen en estudio. ....	339
<b>Tabla 121.</b> Niveles transcripcionales absolutos de los genes analizados, empleados para las comparaciones entre genes. ....	340
<b>Tabla 122.</b> Datos empleados en el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen <i>LAC4</i> . ....	341
<b>Tabla 123.</b> Datos empleados en el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen <i>aox1::ARG4</i> .....	342

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso de degradación de lactosa en la cepa de <i>P. pastoris</i> KM71LAC412.	12
<b>Figura 2.</b> Construcción del plásmido pGAP-LAC412 empleado en la generación de la cepa de <i>P. pastoris</i> KM71LAC412.....	12
<b>Figura 3.</b> Proceso de degradación de lactosa y de producción de proteína recombinante de las cepas de <i>P. pastoris</i> KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC.....	13
<b>Figura 4.</b> Origen de las cepas de <i>P. pastoris</i> y análisis realizados con éstas en el presente trabajo.....	25
<b>Figura 5.</b> Estrategia experimental del primer objetivo particular: cultivos para la evaluación de parámetros fisiológicos. ....	26
<b>Figura 6.</b> Estrategia experimental del primer objetivo particular: análisis de expresión diferencial de genes.....	27
<b>Figura 7.</b> Esquema de amplificación por PCR de la región <i>aox1::ARG4</i> .....	39
<b>Figura 8.</b> Diseño experimental del segundo objetivo particular. ....	48
<b>Figura 9.</b> Estrategia experimental del segundo objetivo particular: diagrama de flujo de los cultivos para la inducción de genes heterólogos regulados por el promotor <i>AOX1</i> ...48	
<b>Figura 10.</b> Metodología general de los ensayos de RT-qPCR. ....	64
<b>Figura 11.</b> Esquema de amplificación de los oligonucleótidos 5qAOX1ARG4 y 3qAOX1ARG.....	69
<b>Figura 12.</b> Ejemplos para la preparación de reacciones para qPCR con SYBR Green. .73	
<b>Figura 13.</b> Estrategia general de selección y modificación de la secuencia del gen de $\beta$ -galactosidasa que se buscó expresar en <i>P. pastoris</i> .....	79
<b>Figura 14.</b> Estrategia para la construcción del vector pGAHbGalgs. Las flechas indican los sitios de restricción XhoI (en negro) y NotI (en blanco).....	80
<b>Figura 15.</b> Estrategia experimental general para la obtención de la cepa de <i>P. pastoris</i> productora de $\beta$ -galactosidasa extracelular. ....	81
<b>Figura 16.</b> Esquema de amplificación y tamaño teórico de los productos de amplificación para la caracterización del plásmido pGAHbGalgs. ....	102
<b>Figura 17.</b> Morfología colonial de las cepas de <i>P. pastoris</i> KM71LAC412 (A) y KM71pPIC9 (B) en agar YPD. ....	135

<b>Figura 18.</b> Caracterización por PCR con oligonucleótidos pGAPF y 3AOX de la cepa KM71LAC412 de la primera cinética de crecimiento en BMLac mediante PCR de paquete celular.....	135
<b>Figura 19.</b> Cinética de crecimiento de <i>P. pastoris</i> KM71LAC412 cultivada en BMGlc, BMGly y BMLac. ....	138
<b>Figura 20.</b> Comparación de la densidad celular y el consumo de sustrato de <i>P. pastoris</i> KM71LAC412. ....	138
<b>Figura 21.</b> Actividad específica, actividad volumétrica y rendimiento producto/biomasa de $\beta$ -galactosidasa promedio de la cepa KM71LAC412 en distintos medios de cultivo a diferentes tiempos. ....	140
<b>Figura 22.</b> Verificación por PCR de la región <i>aox1::ARG4</i> de <i>P. pastoris</i> KM71.....	142
<b>Figura 23.</b> Análisis de la expresión diferencial de las tres comparaciones.....	143
<b>Figura 24.</b> Expresión diferencial de las rutas del metabolismo central. ....	148
<b>Figura 25.</b> Estado de los genes relacionados con el metabolismo central. ....	149
<b>Figura 26.</b> Estado de expresión de los genes de transportadores de carbohidratos en las comparaciones CEPA, SUSTRATO y METANOL. ....	150
<b>Figura 27.</b> Niveles de expresión de los genes de las enzimas involucradas en el metabolismo del metanol en los diferentes transcriptomas.....	151
<b>Figura 28.</b> Estado de los genes de las enzimas involucradas en el metabolismo del metanol en las diferentes comparaciones de los transcriptomas.....	152
<b>Figura 29.</b> Cinéticas de crecimiento de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en BMLac, BMGlc, BMGly y BMLacMet.....	155
<b>Figura 30.</b> Cinéticas de crecimiento de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en BMM, BMLac y BMLacMet. ....	156
<b>Figura 31.</b> Actividad de $\beta$ -galactosidasa, en U/mg proteína intracelular, a las 0, 24 y 48 h de inducción, de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en BMG y BMLac inicial a 30 y 24 °C.....	165
<b>Figura 32.</b> Rendimiento de $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa, en U/mgDCW, a las 0, 24 y 48 h de inducción de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en BMG y BMLac inicial.....	167



<b>Figura 33.</b> Rendimiento de proteínas extracelulares producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 24 y 48 h de inducción, determinadas por el método de Bradford.....	169
<b>Figura 34.</b> Rendimiento de FTEII por unidad de biomasa de KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 0, 24 y 48 h de inducción.....	171
<b>Figura 35.</b> Comparación de los rendimientos de FTEII por unidad de biomasa, y de proteínas extracelulares totales (Bradford) por unidad de biomasa, a las 24 y 48 h de inducción de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII (control). ....	172
<b>Figura 36.</b> Rendimiento de proteínas extracelulares totales producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 24 y 48 h de inducción, determinado por el método de Bradford.....	174
<b>Figura 37.</b> Rendimiento de proteínas extracelulares totales producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 24 y 48 h de inducción, determinado por el método de BCA.....	175
<b>Figura 38.</b> Rendimiento de hGH por unidad de biomasa de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción. ....	176
<b>Figura 39.</b> Porcentaje de hGH en proteína extracelular, determinado por los métodos de Bradford (A) y BCA (B), de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción. ....	178
<b>Figura 40.</b> Análisis de sobrenadantes de las 48 h de inducción por SDS-PAGE. ....	179
<b>Figura 41.</b> Verificación por PCR de los oligonucleótidos para qPCR dirigidos al transcrito <i>aox1::ARG4</i> en cepas de <i>P. pastoris</i> KM71. ....	181
<b>Figura 42.</b> Niveles transcripcionales del gen normalizador <i>G6PD</i> a las 0, 24 y 48 h de inducción. ....	182
<b>Figura 43.</b> Niveles transcripcionales del gen normalizador <i>YPT1</i> a las 0, 24 y 48 h de inducción. ....	183
<b>Figura 44.</b> Niveles transcripcionales del gen <i>GAP</i> a las 0, 24 y 48 h de inducción.....	185
<b>Figura 45.</b> Niveles transcripcionales del gen <i>LAC4</i> a las 0, 24 y 48 h de inducción. ...	186
<b>Figura 46.</b> Niveles transcripcionales del gen <i>FTEII</i> a las 0, 24 y 48 h de inducción....	187
<b>Figura 47.</b> Niveles transcripcionales del gen <i>HGH</i> a las 0, 24 y 48 h de inducción.....	188

<b>Figura 48.</b> Proporción entre los niveles transcripcionales a distintos tiempos de inducción de los genes <i>FTEII</i> y <i>HGH</i> .....	189
<b>Figura 49.</b> Niveles transcripcionales del gen <i>aox1::ARG4</i> a las 0, 24 y 48 h de inducción. ....	190
<b>Figura 50.</b> Niveles transcripcionales del gen <i>AOX2</i> a las 0, 24 y 48 h de inducción....	191
<b>Figura 51.</b> Niveles transcripcionales del gen <i>DAS</i> a las 0, 24 y 48 h de inducción. ....	192
<b>Figura 52.</b> Proporción transcripcional de los genes analizados entre dos tiempos de su inducción. ....	193
<b>Figura 53.</b> Proporción de niveles transcripcionales de los genes regulados por el promotor <i>GAP</i> : <i>GAP</i> y <i>LAC4</i> , empleando una cuantificación absoluta. ....	195
<b>Figura 54.</b> Proporción de niveles transcripcionales de los genes regulados por el promotor <i>AOX1</i> : <i>aox1::ARG4</i> , <i>FTEII</i> y <i>HGH</i> , empleando una cuantificación absoluta. ....	196
<b>Figura 55.</b> Proporción de niveles transcripcionales de los genes <i>AOX</i> : <i>aox1::ARG4</i> y <i>AOX2</i> , empleando una cuantificación absoluta.....	197
<b>Figura 56.</b> Promedio de los niveles transcripcionales de <i>LAC4</i> de la cuantificación relativa-absoluta para las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en todos los tiempos y condiciones de cultivo probadas.....	198
<b>Figura 57.</b> Correlación entre $Y_{p/x}$ y niveles de expresión relativa de genes heterólogos regulados por el promotor <i>AOX1</i> . ....	199
<b>Figura 58.</b> Resultado de la transformación de <i>E. coli</i> TOP10 con el plásmido pCC1-b-GalgsE obtenido a partir de la cepa de <i>E. coli</i> EPI300. ....	201
<b>Figura 59.</b> Obtención del plásmido pCC1-b-GalgsE por extracción a mediana escala y reextracción con solventes orgánicos.....	202
<b>Figura 60.</b> Caracterización por análisis de restricción con las enzimas XhoI y NotI de plásmidos pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII. ....	203
<b>Figura 61.</b> Electroforesis en gel de agarosa del primer intento de purificación y de ligación del inserto b-Galgs y el vector pGAH de la primera construcción. ....	204
<b>Figura 62.</b> Electroforesis para purificación de bandas de inserto b-Galgs y vector pGAH II. ....	205

<b>Figura 63.</b> Electroforesis en gel de agarosa del segundo intento de purificación del inserto b-Galgs y el vector pGAH de la primera construcción. La purificación con kit hace referencia al uso del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).....	206
<b>Figura 64.</b> Electroforesis del inserto y vector purificados y reacción de ligación II de la primera construcción. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (1 µL) Las flechas indican la posición de la banda del inserto b-Galgs.....	207
<b>Figura 65.</b> Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 calcio-competente con la ligación II de la primera construcción.....	208
<b>Figura 66.</b> Electroforesis de las PCR para caracterización de colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con la ligación II de la primera construcción. ....	209
<b>Figura 67.</b> Electroforesis de muestras de DNA plasmídico pGAHbGalgs (primera construcción) a mediana escala.....	210
<b>Figura 68.</b> Digestiones analíticas de pGAHbGalgs (primera construcción).....	211
<b>Figura 69.</b> Obtención de pGAHbGalgs (primera construcción) linealizado con Sall y concentrado. ....	212
<b>Figura 70.</b> Placas de agar RDB sin histidina sembradas con las células de <i>P. pastoris</i> KM71 sometidas a electroporación con el plásmido pGAHbGalgs (primera construcción) linealizado con Sall.....	213
<b>Figura 71.</b> Caracterización mediante PCR con oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS de clonas de <i>P. pastoris</i> KM71 transformadas con el plásmido pGAHbGalgs de la primera construcción. ....	214
<b>Figura 72.</b> Caracterización fenotípica de las células de <i>P. pastoris</i> KM71 pGAHbGalgs provenientes de la segunda transformación mediante cultivo en agar YPD con X-gal. ....	215
<b>Figura 73.</b> Extracción y caracterización de plásmido pCC1-b-GalgsL empleado en la segunda construcción. ....	216
<b>Figura 74.</b> Obtención de plásmido pCC1-b-GalgsL para la segunda clonación.....	217
<b>Figura 75.</b> Obtención y verificación de calidad del inserto b-Galgs y el vector pGAH empleados en la segunda construcción de pGAHbGalgs.....	218
<b>Figura 76.</b> Resultado de la transformación de <i>E. coli</i> TOP10 con las ligaciones A y B del inserto b-Galgs y el vector pGAH de la segunda construcción. ....	219

<b>Figura 77.</b> Caracterización por PCR con oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS de plásmidos de colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con las ligaciones de la segunda construcción. ....	220
<b>Figura 78</b> Caracterización por PCR con oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS de plásmidos de colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con la ligación B de la segunda construcción. ....	221
<b>Figura 79.</b> Electroforesis con post-tinción de PCR previas para comprobación de tamaños de amplicones. ....	222
<b>Figura 80.</b> Obtención de plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción. ....	223
<b>Figura 81.</b> Obtención de pGAHbGalgs de la segunda construcción linealizado con SallI y concentrado. ....	224
<b>Figura 82.</b> Transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 electrocompetente con el plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción linealizado con SallI. ....	225
<b>Figura 83.</b> Caracterización fenotípica de clonas de <i>P. pastoris</i> KM71bGalgs provenientes de la segunda transformación mediante cultivo en agar YPD con X-gal. ....	226
<b>Figura 84.</b> Caracterización por PCR a partir de DNA genómico de dos clonas de <i>P. pastoris</i> KM71bGalgs de la segunda transformación. ....	227
<b>Figura 85.</b> Caracterización mediante análisis de restricción de los plásmidos pCC1-b-Galgs y pGAHbGalgs empleados en las dos primeras construcciones. ....	228
<b>Figura 86.</b> Caracterizaciones de pCC1-b-Galgs mediante análisis de restricción con BglII y BglII + XhoI. ....	229
<b>Figura 87.</b> Caracterizaciones de pGAHbGalgs mediante análisis de restricción con BglII y BglII + XhoI. ....	230
<b>Figura 88.</b> Caracterizaciones mediante análisis de restricción de los plásmidos pGAHbGalgs de la segunda construcción y de pGAHFTEII. ....	231
<b>Figura 89.</b> Caracterizaciones de pGAHbGalgs mediante análisis de restricción con HindIII, BglII, XhoI y Csp45I. ....	232
<b>Figura 90.</b> Caracterizaciones de pGAHFTEII mediante análisis de restricción con BglII y BglII + XhoI. ....	232
<b>Figura 91.</b> Electroforesis de digestiones del plásmido pCC1-b-Galgs obtenido de distintas fuentes con las enzimas de restricción BglII y HindIII. ....	233

<b>Figura 92.</b> Caracterizaciones de pCC1-b-Galgs mediante análisis de restricción con BglII y HindIII.....	234
<b>Figura 93.</b> Caracterización mediante análisis de restricción con HindIII de plásmidos pCC1-b-Galgs obtenidos de diferentes cepas y a diferentes temperaturas de cultivo. ..	235
<b>Figura 94.</b> Reacción de restricción preparativa de pCC1-b-GalgsL con XhoI y NotI..	236
<b>Figura 95.</b> Controles del proceso de ligación de la tercera construcción.....	237
<b>Figura 96.</b> Transformación con la ligación de la tercera construcción de pGAHbGalgs. ....	238
<b>Figura 97.</b> Caracterización mediante análisis de restricción de los plásmidos extraídos de colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con la ligación pGAHbGalgs de la tercera construcción. ....	239
<b>Figura 98.</b> PCR para caracterización de plásmidos resultantes del tercer intento de construcción de pGAHbGalgs.....	241
<b>Figura 99.</b> Reacciones de PCR con el par de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS de los conjuntos de colonias de la tercera construcción. ....	242
<b>Figura 100.</b> Caracterización mediante análisis de restricción con BglII de plásmidos extraídos de colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con la ligación de la tercera construcción de pGAHbGalgs.....	243
<b>Figura 101.</b> PCR para caracterización de plásmidos pGAHbGalgs de las tres construcciones llevadas a cabo, y de la ligación empleada en la tercera construcción. .	244
<b>Figura 102.</b> Resumen gráfico de la posible regulación de los genes <i>LAC</i> en <i>P. pastoris</i> KM71LAC412. ....	269
<b>Figura 103.</b> Mapa del plásmido pGAPZ-LAC412.....	316
<b>Figura 104.</b> Mapa del plásmido pCC1-b-Galgs. ....	320
<b>Figura 105.</b> Mapa del plásmido pGAHbGalgs. ....	321
<b>Figura 106.</b> Gráfica empleada en el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen <i>LAC4</i> . ....	341
<b>Figura 107.</b> Gráfica empleada en el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen <i>aox1::ARG4</i> .....	342

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Los símbolos de elementos y compuestos químicos corresponden a los empleados por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC). Los símbolos empleados en la cuantificación de magnitudes físicas, tanto en unidades básicas como derivadas, corresponden a los empleados por el Sistema Internacional de Unidades.

aa	Residuos de aminoácidos
<i>AOX1</i>	Gen que codifica para la enzima alcohol oxidasa I
<i>aox1::ARG4</i>	Región genética de la cepa de <i>P. pastoris</i> KM71, correspondiente al gen <i>AOX1</i> interrumpido por el gen <i>ARG4</i> de <i>S. cerevisiae</i>
<i>AOX2</i>	Gen que codifica para la enzima alcohol oxidasa II
<i>ARG4</i>	Gen que codifica para la enzima argininosuccinato liasa
ASB	Albúmina sérica bovina
BMG	Medio mínimo amortiguado suplementado con glicerol 1 %
BMGly	Medio mínimo amortiguado suplementado con glicerol 30 mM
BMGlc	Medio mínimo amortiguado suplementado con glucosa 30 mM
BMM	Medio mínimo amortiguado suplementado con metanol 0.75 %
BMM + CaCl <sub>2</sub>	Medio mínimo amortiguado suplementado con metanol 0.75 % y CaCl <sub>2</sub> 0.01 %
Cat.	Número de catálogo
cDNA	DNA complementario
CDS	Secuencia codificante de un gen
CV	Coefficiente de variación
C <sub>T</sub>	Ciclo umbral
<i>DAS</i>	Genes que codifican para las isoformas 1 y 2 de la enzima dihidroxiacetona sintasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DO <sub>600 nm</sub>	Densidad óptica a 600 nm

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
et al.	Y otros ( <i>et alter</i> )
FTEII	Fitasa termoestable II
<i>FTEII</i>	Gen que codifica para la fitasa termoestable II
g	Gravedades
gDCW	Gramos de peso celular seco ( <i>grams of dry cell weight</i> )
g/L	Gramos por litro
<i>G6PD</i>	Gen que codifica para la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, se empleó como gen normalizador
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<i>GAP</i>	Gen que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Gpb	Giga pares de bases o un millón de pares de bases
h	Horas
h <sup>-1</sup>	Por hora
hGH	Hormona del crecimiento humana de 22 kDa
<i>HGH</i>	Gen que codifica para hormona de crecimiento humana, modificado con codones preferenciales de <i>P. pastoris</i>
<i>HIS4</i>	Gen que codifica para la histidinol deshidrogenasa
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>K. phaffii</i>	<i>Komagataella phaffii</i> (nuevo nombre de <i>P. pastoris</i> )
kat	Katal
kb	Kilobase o mil pares de bases
kDa	Kilodalton
KM71FTEII	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de una fitasa termoestable
KM71FTEIILAC	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de una fitasa termoestable, que contiene los genes para una lactosa permeasa y una β-galactosidasa intracelular

KM71HGH22K	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de hGH
KM71HGH22KLAC	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de hGH, que contiene los genes para una lactosa permeasa y una $\beta$ -galactosidasa intracelular
KM71LAC412	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> que contiene los genes para una lactosa permeasa y una $\beta$ -galactosidasa intracelular
KM71pPIC9	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> transformada con el plásmido pPIC9
L	Litros
<i>LAC4</i>	Gen que codifica para una $\beta$ -galactosidasa intracelular de <i>K. lactis</i> , modificado con codones preferenciales de <i>P. pastoris</i>
<i>LAC12</i>	Gen que codifica para una lactosa permeasa de <i>K. lactis</i> modificada con codones preferenciales de <i>P. pastoris</i>
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
log	Logaritmo
M	Concentración molar
mg/mL	Miligramos por mililitro
min	Minutos
mM	Milimolar
Mut <sup>s</sup>	Fenotipo de utilización de metanol lento
ONPG	2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>P<sub>AOX1</sub></i>	Promotor del gen que codifica para la enzima alcohol oxidasa I
<i>P<sub>GAP</sub></i>	Promotor del gen que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de iones hidrógeno
PNPG	4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa



RDB	Medio de regeneración con dextrosa
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
TE	Amortiguador de pH Tris-HCl-EDTA
Tris	Trizma o tris (hidroximetil) aminometano
TSNT	Tritón-SDS-NaCl-Tris-HCl
U	Unidades enzimáticas
USD	Dólar de Estados Unidos
UV	Radiación ultravioleta
X	Número de veces la concentración
$Y_{x/s}$	Rendimiento de biomasa por unidad de sustrato
$Y_{p/x}$	Rendimiento de producto por unidad de biomasa
YNB	Base nitrogenada de levadura
YPD	Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y dextrosa
<i>YPT1</i>	Gen que codifica para una proteína de unión a guanosín trifosfato, se empleó como gen normalizador
%	Porcentaje
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento
$\mu\text{g/mL}$	Microgramos por mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micromolar

## RESUMEN

En el presente estudio, se evaluó el impacto de la lactosa y otras fuentes de carbono sobre el metabolismo y la producción de proteínas heterólogas reguladas por el promotor *AOXI* ( $P_{AOXI}$ ) de cepas de *Pichia pastoris* modificadas para metabolizar lactosa, con secuencias codificantes para  $\beta$ -galactosidasa y lactosa permeasa de *Kluyveromyces lactis*, reguladas por el promotor *GAP* ( $P_{GAP}$ ) de *P. pastoris* (cepa KM71LAC412 [LAC412]), y que expresan hormona del crecimiento humana de 22 kDa (cepa KM71HGH22K-LAC [H-L]) o fitasa FTEII (cepa KM71FTEII-LAC [F-L]) reguladas por  $P_{AOXI}$ .

El estudio se dividió en tres objetivos específicos. En el primero, se realizaron cinéticas de crecimiento de la cepa LAC412 y una cepa control para determinar sus rendimientos biomasa/sustrato ( $Y_{x/s}$ ) y velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ), y se obtuvieron los transcriptomas por RNA-Seq para evaluar los cambios de la expresión genética de LAC412 y la cepa control en medios con lactosa, glucosa y lactosa con metanol. En el segundo, se comparó el efecto de lactosa, respecto a glicerol, sobre los rendimientos de proteínas totales y recombinantes (hGH, FTEII o  $\beta$ -galactosidasa) y la expresión de genes heterólogos en las cepas H-L y F-L, mediante cultivos en dos etapas: 1) generación de biomasa en medio con lactosa o glicerol e 2) inducción con metanol de los genes regulados por  $P_{AOXI}$ . En el tercero, se buscó generar una cepa de *P. pastoris* con un gen sintético de  $\beta$ -galactosidasa extracelular.

Los resultados demostraron que las cepas LAC412, H-L y F-L emplearon lactosa para generar de biomasa, y que su uso, contra glucosa o glicerol, afectó los niveles de expresión a nivel traduccional de los genes heterólogos regulados por  $P_{AOXI}$  y  $P_{GAP}$ , siendo el cultivo a 30 °C con lactosa la condición de mayor producción de hGH o FTEII para las cepas H-L o F-L, a pesar de que los niveles de transcritos de *HGH* y *FTEII* no difirieron entre las condiciones evaluadas. El análisis de transcriptomas mostró que la inserción de los genes de  $\beta$ -galactosidasa y lactosa permeasa afectó la expresión genética, y que el cultivo en lactosa contra glucosa modificó la expresión de ~40 % de los genes. La construcción de *P. pastoris* productora de  $\beta$ -galactosidasa extracelular no fue posible. En conclusión, el uso de lactosa modificó la transcripción global y aumentó la producción de proteína derivada de los genes heterólogos regulados por  $P_{AOXI}$ .

## ABSTRACT

In the present study, the impact of lactose and other carbon sources on the metabolism and heterologous proteins production regulated by the *AOXI* promoter (*PAOXI*) was evaluated for *Pichia pastoris* strains modified to metabolize lactose, with coding sequences for  $\beta$ -galactosidase and lactose permease from *Kluyveromyces lactis*, regulated by the *GAP* promoter ( $P_{GAP}$ ) of *P. pastoris* (strain KM71LAC412 [LAC412]), and expressing human growth hormone (22 kDa) (strain KM71HGH22K-LAC [HL]) or FTEII phytase (strain KM71FTEII-LAC [FL]) regulated by  $P_{AOXI}$ .

The study was divided into three specific objectives. In the first, growth kinetics of strain LAC412 and a control strain were performed to determine their biomass/substrate yields ( $Y_{x/s}$ ) and specific growth rates ( $\mu$ ), and transcriptomes were obtained by RNA-Seq to evaluate gene expression changes of LAC412 and the control strain in media with lactose, glucose or lactose with methanol. In the second, the effect of lactose on total and recombinant proteins (hGH, FTEII or  $\beta$  galactosidase) yields and heterologous genes expression in strains H-L and F-L, was compared to glycerol using cultures in two stages: 1) generation of biomass in lactose or glycerol containing medium and 2) methanol induction of genes regulated by  $P_{AOXI}$ . In the third, the generation of a strain of *P. pastoris* with a synthetic extracellular  $\beta$  galactosidase gene was sought.

The results showed that LAC412, H-L and F-L strains used lactose to generate biomass, and that its use, compared with glucose or glycerol, affected the expression at translational level of the heterologous genes regulated by  $P_{AOXI}$  and  $P_{GAP}$ , with the lactose culture at 30 °C being the condition of highest hGH or FTEII production for H-L or F-L strains, despite the fact that the transcript levels of *HGH* and *FTEII* did not differ between the evaluated conditions. The transcriptome analysis showed that the insertion of the  $\beta$ -galactosidase and lactose permease genes affected gene expression, and that the culture in lactose compared with glucose modified the expression of ~40% of the genes. The construction of a *P. pastoris* strain producing extracellular  $\beta$ -galactosidase was not possible. In conclusion, the use of lactose modified the global transcription and increased the production of protein derived from heterologous genes regulated by  $P_{AOXI}$ .

# 1. INTRODUCCIÓN

*Pichia pastoris* es un microorganismo ampliamente reconocido para la expresión de genes heterólogos y producción de proteínas recombinantes. El promotor más usado para transcribir genes heterólogos en *P. pastoris* proviene del gen de la enzima alcohol oxidasa 1 (AOX1) de este organismo, cuya expresión se activa durante el cultivo en metanol, pero se inactiva durante el cultivo con otras fuentes de carbono, como glucosa. La búsqueda de fuentes de carbono alternativas que representen una ventaja sobre las fuentes de carbono usadas comúnmente para cultivar microorganismos es de interés, por ejemplo, el aprovechamiento de subproductos industriales podría proporcionar fuentes de carbono económicas y disminuiría el manejo de residuos industriales. Uno de estos subproductos es el lactosuero, cuyo principal componente además de agua es lactosa. *P. pastoris* no puede consumir de forma nativa la lactosa, por lo que, previamente en el grupo de trabajo, se modificaron cepas de *P. pastoris* con genes heterólogos codificantes para una  $\beta$ -galactosidasa y una lactosa permeasa de *Kluyveromyces lactis* para que pudiera consumirla con el propósito de utilizarla para generar biomasa. Sin embargo, ya que una de las principales aplicaciones del cultivo de *P. pastoris* es la producción de proteína heteróloga con  $P_{AOX1}$ , y este promotor se reprime en presencia de fuentes de carbono que no sean metanol, no se sabe si el empleo de lactosa tendría un efecto diferencial sobre la producción de otras proteínas heterólogas cuyos genes están regulados por  $P_{AOX1}$ .

En el presente estudio se trabajó bajo la hipótesis de que el empleo de lactosa como fuente de carbono y generación de biomasa por parte de cepas de *P. pastoris* modificadas genéticamente para expresar genes de forma constitutiva que permitan emplear la lactosa, afectaría de forma diferencial los niveles de expresión de genes heterólogos regulados por  $P_{AOX1}$  y otros genes de su metabolismo de esta levadura. Se propuso como objetivo principal la evaluación del impacto de la lactosa y otras fuentes de carbono en el comportamiento metabólico y en la producción de proteínas heterólogas reguladas  $P_{AOX1}$  y  $P_{GAP}$  y otros genes en cepas de *P. pastoris* modificadas genéticamente para utilizar lactosa como fuente de carbono de forma intracelular y extracelular.

El trabajo se dividió en tres secciones principales, correspondientes a los objetivos específicos planteados. El primero, que consistió en evaluar el comportamiento metabólico y analizar los perfiles transcripcionales de las cepas KM71LAC412 y una cepa control cultivadas en lactosa, glucosa, glicerol y lactosa con metanol, se realizó con cinéticas de crecimiento en lactosa, glucosa y glicerol para determinar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y los rendimientos de biomasa por sustrato ( $Y_{x/s}$ ) de ambas cepas. Además se obtuvieron los transcriptomas de KM71LAC412 cultivada en lactosa, glucosa, y lactosa con metanol por RNA-Seq, con el fin de evaluar su expresión genética.

El segundo de los objetivos específicos buscó evaluar el comportamiento metabólico de las cepas KM71FTEII-LAC, KM71HGH22K-LAC y sus respectivas cepas control cultivadas en lactosa, glucosa, glicerol y lactosa con metanol; y el efecto de la lactosa y el glicerol sobre la expresión de genes regulados por  $P_{AOXI}$  y  $P_{GAP}$  y dos genes del metabolismo de metanol mediante RT-qPCR. Para esto, se analizó la respuesta metabólica a través de la determinación de rendimientos y velocidad específica de crecimiento, rendimientos por unidad de biomasa de proteínas extracelulares totales y de proteínas heterólogas reguladas por  $P_{AOXI}$  y  $P_{GAP}$ ; y se cuantificaron los niveles de expresión de los genes regulados por  $P_{AOXI}$  y  $P_{GAP}$ , y de otros genes mediante RT-qPCR.

El tercero buscó construir una cepa de *P. pastoris* que expresara una  $\beta$ -galactosidasa extracelular funcional para evaluar si su consumo de lactosa sería diferente del consumo intracelular de lactosa que presentan las cepas evaluadas en la primera parte del trabajo.

El presente trabajo es el primer estudio metabólico y de expresión de genes a escala global de cepas de *P. pastoris* modificadas para utilizar lactosa como fuente de carbono y que expresan proteínas heterólogas cuyos genes están regulados por  $P_{AOXI}$ . Este estudio permitiría correlacionar el efecto de lactosa con cambios en la expresión de génica, y podría llegar a dar explicaciones del cambio de los niveles de expresión relacionadas con el uso de ciertos promotores y fuentes de carbono. De esta forma se podría conocer la influencia de la lactosa y la factibilidad de su uso en la producción de proteínas recombinantes en el microorganismo. Sería el primer paso para evaluar si el lactosuero, que contiene grandes cantidades de lactosa, podría tener uso en el cultivo de *P. pastoris*, aprovechando este subproducto para disminuir la contaminación que genera.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Lactosa y metabolismo**

#### **2.1.1. Lactosa y lactosuero**

La lactosa es un disacárido formado por glucosa y galactosa que se encuentra en la leche. El lactosuero es un subproducto de la industria lechera, el cual consiste en el líquido que resulta de la elaboración de quesos y que contiene todos los componentes de la leche que no se integran en la coagulación de la caseína. La composición del lactosuero es variable, pero su contenido de lactosa varía entre 42.6 y 60 g/L dependiendo del pH (Carvalho et al. 2013).

El lactosuero se produce y acumula en grandes cantidades, representando un grave problema para su eliminación o su empleo alternativo. Si la producción de suero representa 9 veces la del queso, cada año se producirían cerca de 200 millones de toneladas de suero a nivel mundial (OECD-FAO 2016), lo que significa que al menos se producen 8 millones de toneladas de lactosa. En México, se produce cerca de un millón de toneladas de lactosuero, lo cual representa aproximadamente 50 mil toneladas de lactosa. Se estima que el 47 % del lactosuero se descarga al drenaje, causando un problema serio de contaminación al llegar a ríos y suelos (Valencia-Denicia y Ramírez-Castillo 2009).

Durante las últimas décadas, se han desarrollado tecnologías para el empleo del lactosuero para generar productos de alto valor agregado, sin llegar aún a una solución real que resuelva este problema de su acumulación. Existen varios sectores y tecnologías que han propuesto o implementado su uso, como son a) alimentación animal, b) recuperación de proteínas para aditivos humanos y animales y cosméticos, c) producción de bebidas y otros productos lácteos, d) fermentación de lactosa para la producción de bioetanol y biosurfactantes y e) digestión anaeróbica para la producción de biohidrógeno y biogás (Brito 2013).

El problema que se busca resolver es la acumulación de lactosuero, preferentemente con la generación de productos con un valor económico mayor. Por esta razón, se busca un organismo que combine la capacidad de utilizar el subproducto con la producción de proteínas heterólogas de interés.

Recientemente, se ha logrado el mejoramiento de organismos para uso industrial por medio del rediseño metabólico, mediante la cual se rediseña el metabolismo de los organismos a través de la manipulación genética con el fin de generar productos de interés comercial a partir de recursos renovables y subproductos industriales. Con el surgimiento de las herramientas de biología molecular que permiten una variedad de alternativas, se han comenzado a explorar nuevos caminos para la utilización del lactosuero, debido a que muchos microorganismos no son capaces de degradar la lactosa de forma natural. Se han construido y caracterizado cepas de *Saccharomyces cerevisiae* capaces de degradar la lactosa para la producción de etanol sin organismos intermediarios y se ha analizado su comportamiento y fisiología dentro de un cultivo a nivel matraz (Guimarães et al. 2008c; a).

### **2.1.2. $\beta$ -galactosidasa**

El metabolismo de lactosa por parte de un organismo requiere de una enzima con actividad de  $\beta$ -galactosidasa, que puede ser intracelular o extracelular. En el primer caso, el organismo también necesita una permeasa de lactosa para que el disacárido pueda ser introducido a la célula e hidrolizado en glucosa y galactosa; en caso de ser extracelular, la lactosa se degrada en el medio y los monosacáridos resultantes serán introducidos por la célula mediante sus correspondientes transportadores. Posteriormente, la glucosa entrará en el metabolismo central a través de la glicólisis en la mayoría de los casos, la lactosa, empleando la vía de Leloir. *P. pastoris* no posee de manera natural las enzimas para degradar lactosa ni para su introducción, ni la totalidad de las enzimas requeridas para el metabolismo de galactosa (Kurtzman 2010).

Las  $\beta$ -galactosidasas son un conjunto de enzimas presentes en una gran variedad de organismos, que incluyen bacterias, hongos filamentosos, levaduras, plantas y en órganos animales (Husain 2010), y que poseen las funciones de escisión de lactosa para generar glucosa y galactosa, de transgalactosilación de lactosa a alolactosa y de hidrólisis de alolactosa (Juers et al. 2012). Esta enzima se puede clasificar en cuatro distintas familias de glicosil hidrolasas (GH): 1, 2, 35 y 42, según sus similitudes funcionales (Lombard et al. 2014). Las  $\beta$ -galactosidasas de organismos eucariotas se encuentran en la familia 35,

exceptuando las de *Kluyveromyces lactis* y *K. marxianus*, que se encuentran en la familia 2, junto con la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* (Pereira-Rodríguez 2012).

Las  $\beta$ -galactosidasas presentan cierto nivel de inhibición competitiva por sus productos de hidrólisis, en particular por galactosa. La galactosa actúa como inhibidor a concentraciones de lactosa inferiores a 50 mM (Kim et al. 2004). Ya que *P. pastoris* no puede degradar galactosa, ésta podría acumularse en el interior de las células que hidrolizan lactosa intracelularmente e inhibir la  $\beta$ -galactosidasa. Por tal motivo, es conveniente que se busque la forma de construir una cepa modificada de *P. pastoris* con una  $\beta$ -galactosidasa con menor inhibición por galactosa, o que se modifique para secretar la enzima sin disminuir su actividad funcional, de forma que se logre una menor inhibición por producto.

#### **2.1.2.1. Características de la $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis***

La  $\beta$ -galactosidasa producida por la levadura *K. lactis* es una proteína tetramérica (dímero de dímeros), con un peso molecular de 124 kDa por monómero y estabilizada por interacciones iónicas e hidrofóbicas. Cada monómero se pliega en cinco dominios, con un patrón conservado con las enzimas procariontas de la familia de GH 2. Sin embargo, a pesar de encontrarse en la misma familia que la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, los determinantes del mecanismo de reacción propuesto para la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* no se encuentran en el sitio activo de la enzima de *K. lactis* (Pereira-Rodríguez 2012).

Las características cinéticas determinadas para la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, producida de manera recombinante en *E. coli* son: temperatura óptima de 37 °C, pH óptimo de 7,  $K_m$  de 1.5 mM y  $V_{max}$  de 562  $\mu$ Mol/min/mg empleando ONPG como sustrato; y temperatura óptima de 40 °C, pH óptimo de 7,  $K_m$  de 19.8 mM y  $V_{max}$  de 569  $\mu$ Mol/min/mg empleando lactosa como sustrato (Kim et al. 2003). Una preparación comercial de la misma enzima (Maxilact LX-5000) presentó los siguientes parámetros cinéticos: con ONPG como sustrato, temperatura óptima de 40 °C, pH óptimo de 6.6 a 7 (Zhou y Chen 2001),  $K_m$  de 1.7 mM y  $V_{max}$  de 78  $\mu$ Mol/min/mg; y con lactosa como sustrato,  $K_m$  de 17.3 mM y  $V_{max}$  de 124  $\mu$ Mol/min/mg (Cavaille y Combes 1995). La caracterización de la preparación comercial Maxilact LX-5000, que contiene la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, a diferentes temperaturas y pH mostró que a pH 5 la enzima



no hidroliza lactosa, mientras que a pH 6 puede hidrolizar hasta el 90 % de la lactosa de una solución de lactosa al 5 % p/v; y que a 30 °C hidroliza al menos el 70 % de la lactosa a pH entre 6 y 7 (Bosso et al. 2016), concordando con el dato reportado de que la enzima tiene muy poca actividad a pH inferiores a 6 y superiores a 9 (Kim et al. 2003). Estos parámetros indicarían que la enzima puede tener actividad en las condiciones de cultivo de *P. pastoris* (30 °C y pH 6), sin embargo, la actividad de ésta podría disminuir junto con el pH del cultivo.

#### **2.1.2.2. Características de la $\beta$ -galactosidasa de *Paecilomyces aeruginus***

La  $\beta$ -galactosidasa de *P. aeruginus* es una glicosil hidrolasa perteneciente a la familia GH 35, a diferencia de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, la cual se encuentra en la GH 2. Similar a la mayoría de las  $\beta$ -galactosidasas de la familia GH 35, es una proteína monomérica de alto peso molecular, de 118 kDa (109 kDa deglicosilada). Esta enzima se ha producido en *P. pastoris* para su caracterización, empleando un vector de expresión con la secuencia codificante nativa bajo el control del promotor *AOX1* inducible con metanol. La enzima recombinante producida en *P. pastoris* mostró una actividad máxima a pH 4.5 y estabilidad en un rango de pH de 4.5-8.5 a 55 °C por 30 min, alcanzando su actividad óptima a 60 °C, conservando 35 % de actividad relativa a 30 °C. Sus parámetros cinéticos son: actividad específica de 820 U/mg,  $K_m$  de  $0.65 \pm 0.02$  mM y  $V_{max}$  de  $944 \pm 20.1$   $\mu$ Mol/min/mg empleando ONPG como sustrato; actividad específica de 554 U/mg,  $K_m$  de  $0.51 \pm 0.01$  mM y  $V_{max}$  de  $704 \pm 8.1$   $\mu$ Mol/min/mg empleando PNPG como sustrato; y  $K_m$  de  $32.6 \pm 1.3$  mM y  $V_{max}$  de  $315 \pm 7.2$   $\mu$ Mol/min/mg empleando lactosa como sustrato.

#### **2.1.2.3. Preparaciones comerciales de $\beta$ -galactosidasa**

Las principales  $\beta$ -galactosidasas utilizadas en la industria se obtienen de *Aspergillus* sp. y *Kluyveromyces* sp., siendo la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* una de las enzimas más usadas (Bosso et al. 2016). La **Tabla 1** muestra algunas de las preparaciones comerciales de  $\beta$ -galactosidasa disponibles, indicando el organismo utilizado como fuente de la enzima y la actividad reportada para la enzima (Zolnere y Ciprovica 2017).

**Tabla 1.** Preparaciones de  $\beta$ -galactosidasas disponibles comercialmente.

Nombre comercial	Proveedor	Fuente de la enzima	Actividad
Enzeco Lactase NL	Enzyme Development Corporation., NY, EUA	<i>Kluyveromyces</i> sp.	NR
GODO-YNL2	Danisco A/S, Dinamarca	<i>K. lactis</i>	5000 U/g
Maxilact LX5000	Sedim Cedex, Francia	<i>K. lactis</i>	5000 U/g
Maxilact-L/2000	Gist-Brocades	<i>K. lactis</i>	2000 U/g
Lactozym 2600L	Novozymes	<i>K. lactis</i>	2600 U/g
Lactomax Pure	Prozyn, Brasil	<i>K. lactis</i>	NR
Lactozym Pure 6500L	Novozymes	<i>K. lactis</i>	1320 U/mL
Ha-Lactase 5200	Chr. Hansen, Dinamarca	<i>K. lactis</i>	8040 U/g
Lactozym 3000L HPG	Novo Nordisk	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	3000 U/mL
Lactomax F30	Prozyn, Brasil	<i>Aspergillus oryzae</i>	NR
Bio-Cat	INC/USA	<i>A. oryzae</i>	5000 U/g
Enzeco Fungal Lactase	Enzyme Development Corporation., NY, EUA	<i>A. oryzae</i>	NR
Lactase 100	Specialty Enzymes & Biotechnologies y Advanced Enzymes	<i>A. oryzae</i>	NR
Biolactase NTL	Biocon, España	<i>Bacillus circulans</i>	553 U/mL
Saphera	Novozymes	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	NR

Tabla adaptada de revisión (Zolnere y Ciprovica 2017), con la adición de los productos Enzeco Fungal Lactase, Lactase 100 y Saphera (información del producto). NR: No reportado

#### 2.1.2.4. Aplicaciones industriales de $\beta$ -galactosidasa

La principal aplicación industrial de las  $\beta$ -galactosidasas es en la industria de lácteos para la generación de productos deslactosados. Actualmente, 70 % de la población mundial sufre de intolerancia a la lactosa debida a la no persistencia de la lactasa en la edad adulta (Heine et al. 2017). Los alimentos libres de lactosa representan un mercado de 8,030 millones USD en 2016 (BusinessWire 2017). Este segmento tiene un crecimiento regular por el incremento de personas intolerantes a la lactosa y por la percepción saludable que se tiene de productos etiquetados como “libres de”.

La aplicación de  $\beta$ -galactosidasa en procesos industriales depende principalmente de las condiciones de la reacción de hidrólisis empleándose en productos lácteos que tienen distintos pH, por ejemplo suero dulce y leche bovina (de pH 6.0 a 7.0) y suero ácido (pH menor a 5.0) (Zolnere y Ciprovica 2017).

Otra aplicación industrial de  $\beta$ -galactosidasa es la generación de galactooligosacáridos (GOS) a partir de lactosa. El interés en el mercado de GOS tiene un alto crecimiento por el incremento en la demanda de fórmula infantil y por los nuevos

productos en sectores de bebidas y lácteos, además de sus propiedades nutracéuticas, incluyendo la estimulación del crecimiento de bifidobacterias, prevención de cáncer de colon y ser un endulzante no cariogénico (Torres et al. 2010). El mercado de GOS se estimó en 643.3 millones USD en 2015 (GrandViewResearch 2016) y se calcula un crecimiento rápido del mismo debido a su creciente incorporación en fórmulas lácteas.

### **2.1.3. Modificaciones en levaduras para producción de $\beta$ -galactosidasa**

#### **2.1.3.1. Modificaciones en *S. cerevisiae* para producción de $\beta$ -galactosidasa**

La modificación genética de una levadura que no metaboliza lactosa de forma natural para que pueda emplearla como fuente de carbono necesita de la inserción de un gen de  $\beta$ -galactosidasa y otro de permeasa de lactosa en caso de que la  $\beta$ -galactosidasa posea actividad intracelular. Tanto *S. cerevisiae* como *P. pastoris* carecen de una enzima con actividad de  $\beta$ -galactosidasa nativa, pero estos organismos han sido modificados genéticamente para expresar esta enzima, con fines de producción enzimática o de transformación de lactosuero a productos de valor agregado. Sin embargo, el objetivo principal de estas modificaciones no consistía en el uso de lactosuero como fuente de carbono para el crecimiento del organismo. A continuación, se revisarán algunos ejemplos de estas modificaciones.

El primer reporte de cepas de *S. cerevisiae* capaces de crecer en medio con lactosa empleó un plásmido que contenía una región del genoma de *K. lactis* que incluía al gen *LAC4*. En ese mismo reporte, se descubrió el gen de la permeasa de lactosa de *K. lactis* en la región genómica incluida en el plásmido. Gracias a la presencia de ambos genes, *LAC4* y *LAC12*, *S. cerevisiae* fue capaz de metabolizar lactosa intracelularmente (Sreekrishna y Dickson 1985). Previamente, se había modificado a esta levadura transformándola únicamente con el gen *LAC4*, pero se comprobó que era incapaz de crecer en medio con lactosa debido a la ausencia de permeasas específicas para este disacárido (Dickson 1980). La transformación con *LAC4* y el gen *lacY* (codificante para la permeasa de lactosa de *E. coli*) tampoco resultó exitosa al momento de cultivar a la cepa en medio con lactosa (Sreekrishna y Dickson 1985).

Desde entonces, se han construido y caracterizado cepas de *S. cerevisiae* capaces de degradar la lactosa para la producción de etanol sin organismos intermediarios, y se ha analizado su comportamiento y fisiología en cultivos. El primer estudio que introdujo un vector de expresión con genes de  $\beta$ -galactosidasa (*LAC4*) y lactosa permeasa (*LAC12*) de *K. lactis* a *S. cerevisiae*, con el fin de generar un sistema para producir etanol a partir de lactosa evitando el crecimiento diauxico, resultó en un comportamiento de *S. cerevisiae* similar al de otras levaduras que fermentan lactosa de forma nativa (Domingues et al. 1999). Un estudio posterior con esta cepa, en el que se realizó un proceso de evolución adaptativa en medio con lactosa, le permitió consumir lactosa dos veces más rápido (Guimarães et al. 2008b). También se ha llevado a cabo un análisis de transcriptoma de la cepa de *S. cerevisiae* con *LAC4* y *LAC12* y de la cepa evolucionada, encontrándose 173 genes expresados diferencialmente, con funciones relacionadas con estrés, control del ciclo celular, regulación de mitosis, glicólisis y fermentación alcohólica (Guimarães et al. 2008a). Otros grupos de trabajo también han modificado a *S. cerevisiae* con los genes *LAC4* y *LAC12*, diseñándola además para que los genes estuvieran regulados bajo el control de un promotor inducible con galactosa, y para que fuera estable mitóticamente (Rubio-Teixeira et al. 1998).

Los estudios que buscaban la secreción de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* por *S. cerevisiae*, insertando un vector de expresión con el gen *LAC4* fusionado a una secuencia señal, no fueron exitosos en un principio, puesto que los intentos de secreción de dicha proteína por parte de *S. cerevisiae*, mediante la fusión de *LAC4* con una secuencia codificante de péptido señal, resultaron en su retención en el espacio periplásmico debido a su tamaño (Becerra et al. 1997). A consecuencia de lo anterior, se buscaron otras formas de facilitar su liberación al medio, por ejemplo, produciendo heterológamente la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* en una cepa de *S. cerevisiae* mutante autolítica termosensible con remediación osmótica (Becerra et al. 1997). Sin embargo, solamente se buscaba la producción de  $\beta$ -galactosidasa y su liberación mediante choque osmótico para facilitar su purificación, no la modificación del metabolismo de la cepa. Estudios posteriores buscaron la transformación de medios con lactosa en otros productos, logrando que *S. cerevisiae* fermentara lactosa de suero de leche salado a etanol, mediante la fusión de protoplastos con *K. lactis* CBS 683 (Tahoun et al. 1999).

El uso de cepas mutantes supersecretoras de *S. cerevisiae*, a las cuales se les insertó un vector de expresión para una proteína de fusión con la secuencia señal del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* y con la secuencia codificante de *LAC4* de *K. lactis*, obtuvo un porcentaje de secreción mayor que las cepas de fenotipo silvestre, pero menor que para otras proteínas heterólogas para las mismas cepas (Becerra et al. 2001). Una explicación del fenómeno considerada por los autores fue el hecho de que las células de levadura secretan con mayor eficiencia proteínas extracelulares más pequeñas que una proteína oligomérica citoplasmática como la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. Esta misma cepa fue capaz de crecer eficientemente en medio con más de 60 g/L de lactosa y en lactosuero permeado de ultrafiltración (Beccerra et al. 2002). La tasa de crecimiento en suero fue más alta que las de otras cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que expresan los genes *LAC4* y *LAC12*.

Otros estudios mostraron la secreción de  $\beta$ -galactosidasa heteróloga en el medio de cultivo por varias cepas mutantes de *S. cerevisiae* autolíticas termosensibles con remediación osmótica, lo cual les confirió nuevas habilidades metabólicas, ya que las cepas fueron capaces de crecer en medio con lactosa (Becerra et al. 2004).

### **2.1.3.2. Modificaciones en *P. pastoris* para producción de $\beta$ -galactosidasa**

La levadura *P. pastoris* se ha modificado para expresar  $\beta$ -galactosidasas de otras especies, entre las que destacan las de *Alicyclobacillus acidocaldarius*, producida de forma extracelular (Yuan et al. 2008); de *Paecilomyces aeruginus*, cuya expresión fue controlada por  $P_{AOXI}$  y secretada a 22 mg/mL con actividad de 9500 U/mL, actividad óptima a 50 °C y pH 5 (Katrolia et al. 2011); de *Lactobacillus crispatus*, el primer reporte de expresión de una  $\beta$ -galactosidasa heterodimérica, presentando una actividad de hasta 31 U/mL y una actividad óptima a 50 °C y pH 5.5-6.5 (Nie et al. 2013); y de *Aspergillus oryzae*, cuya secuencia codificante fue modificada con codones preferenciales para *P. pastoris*, y la enzima presentó una actividad de 4239.07 U/mL (Zhao et al. 2014). En la **Tabla 2** se muestra una lista de las  $\beta$ -galactosidasas que se han producido heterológamente en *P. pastoris*.

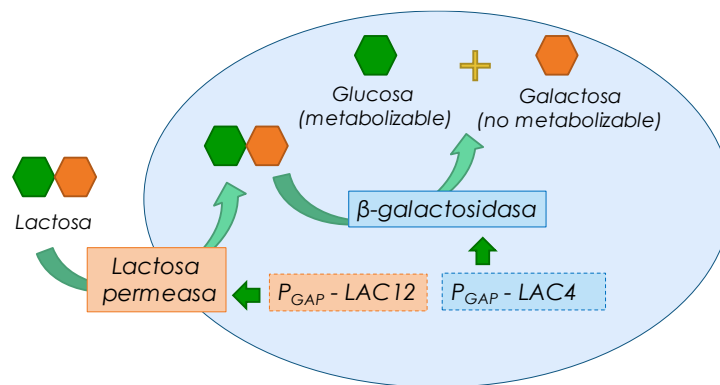
**Tabla 2.**  $\beta$ -galactosidasas expresadas heterológicamente en *P. pastoris*.

Origen del gen de $\beta$ -galactosidasa	Cepa de <i>P. pastoris</i>	Vector	Rendimiento o actividad específica reportados	Referencia
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>	GS115	pPIC9	15 U/mg (intracelular, 10 veces menos actividad extracelular)	(Souza Macêdo 2001)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	GS115	pPIC9	0.1392 U/mL, 0.3702 U/mL, 0.2214 U/mL (intracelular, no se detectó actividad extracelular)	(Liu 2004)
<i>Aspergillus candidus</i>	NR	pPIC9	6 mg/mL, 3600 U/mL (5 L) AE: 706.5 $\pm$ 2.6 U/mg	(Zhang et al. 2005)
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ATCC 27009	GS115	pPIC9	20 U/mL, 90 mg/L (3.7 L) AE (purificada): 229 U/mg (ONPG)	(Yuan et al. 2008)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NR	pPICZ $\alpha$	Actividad detectable en medio de cultivo a las 24 h con máximo a 72-96 h.	(Gantulga et al. 2008)
<i>Bifidobacterium infantis</i>	X-33	NR	NR	(Jung y Lee 2008)
<i>Bispora</i> sp. MEY-1	GS115	pPIC9	0.8 U/mL (200 mL) AE (purificada): 99.5 U/mg	(Wang et al. 2010)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NR	pPICZ $\alpha$	Niveles "extremadamente bajos".	(Gantulga et al. 2009)
<i>Arthrobacter</i> sp. 32c	GS115	pGAPZ $\alpha$ A pPICZ $\alpha$ A	137 mg/L (promotor AOX1), 97 mg/L (promotor GAP) (1 L) AE: 155 U/mg a 50 °C (ONPG)	(Hildebrandt et al. 2009)
<i>Biblioteca metagenómica</i>	GS115	pPIC9Z $\alpha$ B	300 mg/L AE: 243 U/mg (ONPG), AE: 25.4 U/mg (lactosa) (100 mL)	(Wang et al. 2010)
<i>Aspergillus niger</i> van Tiegh	GS115	pPICZ $\alpha$ A	Nativa: V <sub>max</sub> : 172 $\mu$ Mol/min mg, K <sub>m</sub> : 2.21 mM, K <sub>i</sub> : 0.76 mM Mutante: V <sub>max</sub> : 111 $\mu$ Mol/min mg, K <sub>m</sub> : 3.76 mM, K <sub>i</sub> : 6.46 mM	(Hu et al. 2010)
<i>Paecilomyces aeruginus</i> GY701	GS115	pPIC9K	22.1 mg/mL, 9500 U/mL (1.5 L) AE (purificada): 820 U/mg (ONPG), 554 U/mg (PNPG)	(Katrolia et al. 2011)
<i>Homo sapiens</i>	KM71	pPIC9	No reportado.	(Usui et al. 2012)
<i>Raphanus sativus</i>	KM71	pPICZ $\alpha$ C	AE: 64.9 U/mg (10 veces (qué) la de la enzima nativa) (50 mL)	(Kotake et al. 2005)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	X-33	pGAPZ $\alpha$ A	500-1200 pkat/mg (XLLG), 5 pkat/mg (xiloglucano) (50 mL)	(Sampedro et al. 2012)
<i>Arthrobacter chlorophenicolicus</i>	GS115	pGAPZ $\alpha$ B	NR	(Wanarska y Kur 2012)
<i>Bifidobacterium animalis</i> .	GS115	pPIC9	7.42 U/mL (290 % mayor que tipo silvestre)	(Nie et al. 2012)
<i>Lactobacillus crispatus</i> B470	GS115	pPIC9	24.5 y 31.0 U/mL AE (purificada): 221 U/mg (PNPG) (nativa: 178 U/mg)	(Nie et al. 2013)
<i>Biblioteca metagenómica</i>	GS115	pPICZ $\alpha$ B	14.94 U/mL (lactosa), 518.74 U/mL (ONPG), 5.81 U/mL (medio no optimizado)	(Li et al. 2013)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	KM71	pPIC3.5K	204.9 U/mL (3 L, 80 h), 50.3 U/mL (matraz, 120 h). AE (purificada): 152.3 U mg <sup>-1</sup> (ONPG)	(Sun et al. 2014)
<i>Escherichia coli</i>	yDT39	pBLMET-pGAP- $\beta$ gal	NR	(Larsen et al. 2014)
<i>Aspergillus nidulans</i>	X-33	pGAPZ $\alpha$	AE rIacA: 29.2 $\pm$ 1.3 $\mu$ mol/min mg AE rIacB: 2.9 $\pm$ 0.1 $\mu$ mol/min mg	(Dragosits et al. 2014)
<i>Aspergillus niger</i>	X-33	pGAPZ $\alpha$	AE: 89.3 $\pm$ 5.6 $\mu$ mol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	(Dragosits et al. 2014)
<i>Escherichia coli</i>	GS115	pGAP	Cepa de alta expresión: 14570 U/gDCW Cepa de baja expresión: 3325 U/gDCW	(Nie et al. 2014)
<i>Aspergillus oryzae</i>	SMD1168H	pGAPZ $\alpha$ A	4,239.07 U/mL (ONPG), 6.24 g/L	(Zhao et al. 2014)
<i>Homo sapiens</i>	X-33 y GS115	pPICZ $\alpha$ A	Cerca de 0.05 mg/mL	(Tarullo 2014)
<i>Solanum lycopersicum</i>	SMD1168H	pPICZ $\alpha$ A	NR	(Eda et al. 2015)
<i>Planococcus</i> sp – LA	KM71H y GS115	pPICZ $\alpha$ A	3.7 U/mL al día 11 en KM71H, 20 % más alto que la mejor clona de GS115.	(Mahdian et al. 2016)

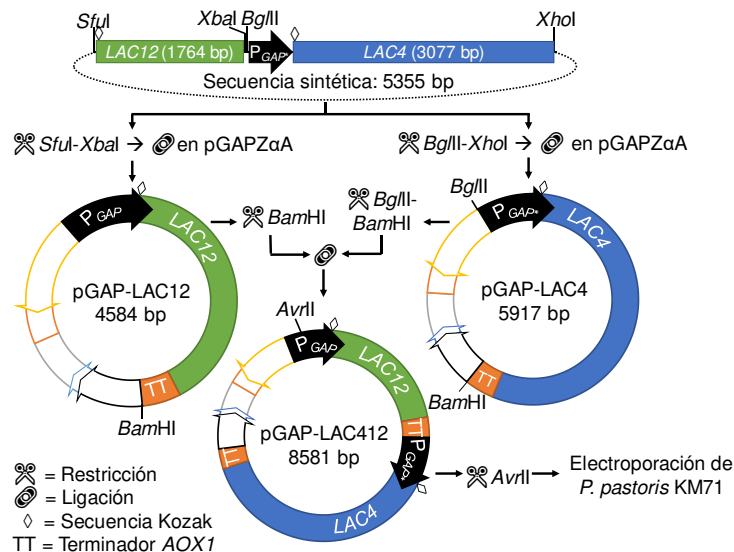
NR: No reportado

### 2.1.3.2.1. Modificaciones en *P. pastoris* para producción de $\beta$ -galactosidasa realizadas en el grupo de trabajo

En el grupo de trabajo, previamente se construyó una cepa de *P. pastoris* capaz de emplear lactosa como fuente de carbono, denominada KM71LAC412 (Castillo-Galván, tesis por publicar). Ésta se generó mediante la transformación de la cepa de *P. pastoris* KM71 con el vector pGAP-LAC412, que incluye secuencias codificantes para la  $\beta$ -galactosidasa y la lactosa permeasa de *K. lactis*, modificadas con los codones preferenciales para *P. pastoris* y reguladas por el promotor constitutivo GAP. Se muestra un esquema del metabolismo de lactosa empleado por la cepa KM71LAC412 en la **Figura 1**, y la construcción del vector empleado en su modificación genética en la **Figura 2**.



**Figura 1.** Proceso de degradación de lactosa en la cepa de *P. pastoris* KM71LAC412.



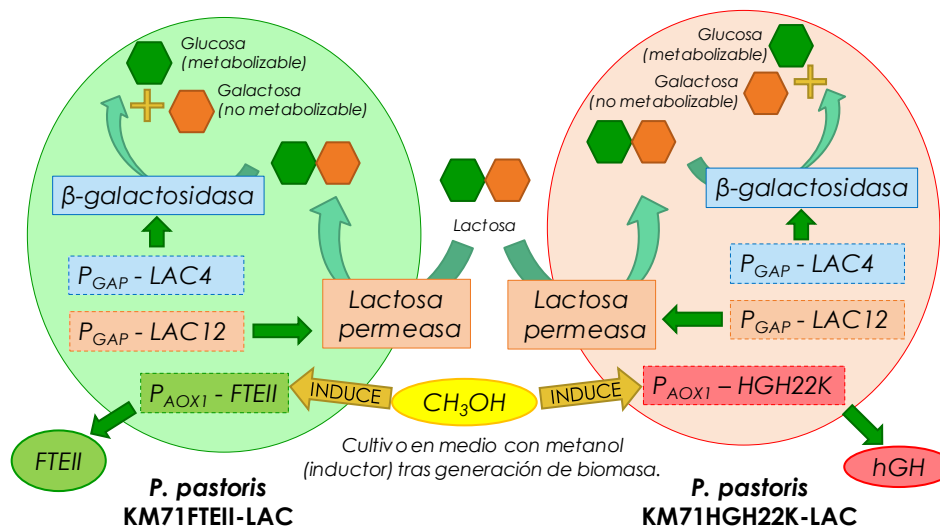
**Figura 2.** Construcción del plásmido pGAP-LAC412 empleado en la generación de la cepa de *P. pastoris* KM71LAC412.

En el grupo de trabajo también se han generado las cepas de *P. pastoris* KM71FTEII-LAC (Herrera-Estala 2015) y KM71HGH22K-LAC (Balderas-Cisneros 2016), las cuales son capaces de emplear lactosa como fuente de carbono y producir una proteína heteróloga al ser inducidas con metanol.

La cepa de *P. pastoris* KM71FTEII-LAC deriva de la cepa KM71FTEII (Viader-Salvadó et al. 2010), esta última transformada con la secuencia que codifica para la fitasa termoestable recombinante FTEII regulada por el promotor *AOX1* inducible con metanol. La cepa KM71FTEII-LAC también es capaz de permear y degradar lactosa debido a que fue transformada con el vector pGAP-LAC412, el mismo empleado en la modificación de la cepa KM71LAC412.

La cepa de *P. pastoris* KM71HGH22K-LAC deriva de la clona 12 de la cepa KM71hGH-22Ks, la cual fue transformada con la secuencia optimizada con codones preferenciales para *P. pastoris* que codifica para la hormona del crecimiento humana (isoforma 22K), regulado por el promotor *AOX1* inducible con metanol. Análogamente a la cepa KM71FTEII-LAC, la cepa KM71HGH22K-LAC se generó a partir de la cepa KM71hGH-22Ks al ser transformada con el vector pGAP-LAC412.

Los procesos metabólicos de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC se esquematizan en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Proceso de degradación de lactosa y de producción de proteína recombinante de las cepas de *P. pastoris* KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC.



## 2.2. *Pichia pastoris*

### 2.2.1. Características del organismo y usos en biotecnología

*P. pastoris* es una levadura metilotrófica comúnmente utilizada para la expresión de proteínas recombinantes mediante modificación genética. Como sistema de expresión de proteínas heterólogas, *P. pastoris* presenta algunas ventajas para la producción de dichas proteínas en comparación con otros sistemas de expresión (Cereghino y Cregg 2000; Macauley-Patrick et al. 2005; Daly y Hearn 2005), entre las cuales se encuentran su relativa facilidad de cultivo y de manipulación genética al permitir la integración del DNA de interés en el genoma de la levadura. Además de las características que lo hacen idóneo para la producción de proteínas recombinantes, *P. pastoris* es considerado un organismo modelo para determinar las rutas metabólicas de asimilación de metanol, como modelo eucariota para el estudio de la biogénesis de peroxisomas (Gould et al. 1992; Faber et al. 1998) y para el desarrollo de modelos metabólicos de organismos empleados en la producción de proteínas heterólogas (Sohn et al. 2010).

*P. pastoris* también tiene la capacidad para producir y secretar altos niveles de proteínas recombinantes, que además pueden ser modificadas postraduccionalmente por este hospedero (Cereghino y Cregg 1999). Este hecho es relevante al momento de la producción de proteínas eucariotas, ya que en numerosas ocasiones se requiere que éstas presenten modificaciones, como glicosilación, formación de puentes disulfuro o procesamiento proteolítico, para su correcto funcionamiento. Otra ventaja que presenta este organismo es su preferencia por crecer con un metabolismo respiratorio en lugar de uno fermentativo, lo que maximiza el rendimiento de la fuente de energía que utiliza como sustrato. Por último, este sistema de expresión se encuentra disponible en forma comercial (ThermoFisherScientific 2018) lo cual facilita su accesibilidad y uso generalizado.

*P. pastoris* es relativamente fácil de cultivar a densidades celulares de aproximadamente 100 g/L en peso seco (Cereghino et al. 2002), y, de manera general, los bioprocesos con este organismo se llevan a cabo en tres fases (Inan y Meagher 2001b). La primera consiste en la generación de biomasa empleando como fuente de carbono glicerol o glucosa. En esta fase, si se utiliza el promotor *AOX1*, la expresión de proteínas heterólogas se encuentra reprimida (Inan y Meagher 2001a). En la segunda fase, se

disminuye la adición de la fuente de carbono en el cultivo, para que se consuma la fuente de carbono y los metabolitos generados en la primera fase, como etanol y acetato, que pueden reprimir al promotor *AOXI* inducible con metanol. En la última fase, se adiciona metanol al cultivo como única fuente de carbono, promoviendo así la expresión del gen y la producción de la proteína heteróloga (Cereghino y Cregg 2000; Ecamilla-Treviño et al. 2000).

Para la secreción por parte de *P. pastoris* de la proteína heteróloga al medio de cultivo se utilizan vectores que poseen una secuencia señal, como la secuencia prepro del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* o la secuencia señal de la fosfatasa ácida (*PHO1*) de *P. pastoris* (Ecamilla-Treviño et al. 2000; Macauley-Patrick et al. 2005).

### **2.2.2. Promotores empleados en el sistema de expresión de *P. pastoris* y su regulación**

El sistema de expresión de *P. pastoris* consiste en vectores de integración y cepas de esta levadura genéticamente modificadas. La regulación de la expresión del gen heterólogo de interés se lleva a cabo de forma precisa por promotores sensibles a fuentes de carbono específicas empleadas como sustrato. El promotor más usado para la expresión de genes heterólogos en *P. pastoris* proviene del gen de la enzima alcohol oxidasa 1 (*AOXI*), cuya expresión es alta y regulada por metanol (Ellis et al. 1985). Este promotor es uno de los más eficientes y fuertemente regulados de los conocidos actualmente para este sistema y su mecanismo de regulación ha sido extensamente revisado (Vogl y Glieder 2013). La capacidad para mantener los cultivos con la expresión heteróloga reprimida en ausencia de metanol es importante para minimizar el efecto tóxico que podrían presentar algunas proteínas heterólogas sobre el hospedero y para disminuir la carga metabólica que representaría la expresión constitutiva de la proteína recombinante. Los niveles de proteína heteróloga más altos obtenidos en *P. pastoris*, 22 g/L intracelular (liala de hidroxinitrilo de *Hevea brasiliensis*) (Hasslacher et al. 1997) y 15 g/L secretada (gelatina de 21 kDa *COL3A1* de rata) (Werten et al. 1999) han sido alcanzados con el uso del promotor *AOXI* (Vogl y Glieder 2013). Sin embargo, las fuentes de carbono comunes como glicerol, glucosa o etanol reprimen la expresión de los genes regulados por *AOXI* (Inan y Meagher 2001a). Debido a que las cepas de *P. pastoris* capaces de metabolizar

lactosa generadas en el grupo de trabajo (KM71LAC412, KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC) no metabolizan la galactosa, no se sabe el impacto que tendría este carbohidrato residual en la expresión de genes heterólogos regulados por el promotor *AOXI* si se emplea lactosa en la fase de generación de biomasa del cultivo. Sin embargo, un estudio preliminar del grupo de trabajo mostró que la cepa KM71HGH22K-LAC fue capaz de expresar hGH después de inducir con metanol la biomasa generada en medio con lactosa (Balderas-Cisneros 2016).

Existen promotores alternativos al promotor *AOXI* empleados en el sistema de producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, los cuales evitan el uso de metanol. Entre estos promotores se encuentra el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAP*), que presenta expresión constitutiva en glucosa, con niveles comparables a los obtenidos con el promotor *AOXI*; sin embargo, sus niveles de actividad cuando las células se cultivan en glicerol o metanol son dos tercios y un tercio, respectivamente, comparados con la expresión lograda en glucosa (Waterham et al. 1997). Este promotor se considera como uno de los más adecuados para una producción a gran escala, ya que se elimina el riesgo y el costo de las cantidades de metanol necesarias para la inducción del promotor *AOXI* (Zhang et al. 2009).

Los promotores de *AOXI* y *GAP* son los más empleados en la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* a gran escala. Sin embargo, una revisión de los promotores empleados en *P. pastoris* muestra al menos 20 promotores alternativos a estos dos que se han empleado para dicho fin (Vogl y Glieder 2013). Se sabe que, en *P. pastoris*, los promotores con mayor actividad e inducibles con metanol son los de los genes *AOXI*, *DAS1*, *DAS2*, *PMP20*, *CAT1*, *FDH1*, *FLD1*, y los que presentan actividad intermedia son los de los genes *TAL2*, *FBA2*, *PEX5*, *DAK1* (Vogl et al. 2016). También se han identificado promotores inducibles sin metanol e inducibles con glucosa empleando análisis microarreglos (Prielhofer et al. 2013), con el fin de disponer de promotores regulables por otras fuentes de carbono.

## **2.3. Análisis global de la expresión de genes**

### **2.3.1. Técnicas empleadas en el análisis de transcriptoma**

La transcriptómica estudia el RNA transcrito en condiciones, tiempo y tipos celulares específicos. Para esto cuenta con varias herramientas, siendo las más usadas los microarreglos y la secuenciación de RNA (RNA-Seq) (Lowe et al. 2017). Los microarreglos cuantifican la abundancia de un conjunto definido de transcritos mediante su hibridación con un arreglo de sondas complementarias, permitiendo el estudio de miles de transcritos simultáneamente. El RNA-Seq emplea una secuenciación en paralelo masiva que permite el análisis de transcriptoma de genomas a una mayor resolución que la obtenida con la secuenciación de Sanger o los métodos basados en microarreglos. En el método de RNA-Seq, los cDNA generados a partir de la muestra de RNA de interés se secuencian directamente usando tecnologías de secuenciación de última generación. Las lecturas obtenidas entonces pueden alinearse con un genoma de referencia para construir un mapa completo del transcriptoma (Nagalakshmi et al. 2010). Posteriormente, los resultados obtenidos pueden validarse mediante RT-qPCR.

El RNA-Seq se refiere a la combinación de las técnicas de secuenciación masiva con los métodos bioinformáticos para capturar y cuantificar transcritos presentes en un extracto de RNA. Las secuencias generadas típicamente presentan un tamaño de 100 pb, pero su longitud puede estar en un rango de 30 a 10,000 pb, dependiendo del método de secuenciación. El RNA-Seq potencializa la secuenciación del transcriptoma con muchos fragmentos cortos de un transcriptoma para permitir la reconstrucción computacional del transcrito original mediante el alineamiento de las lecturas con un genoma de referencia o entre sí (ensamblaje *de novo*). El RNA-Seq puede emplearse para la identificación de genes dentro de un genoma o identificar genes que se encuentran activos en determinado tiempo, y la cantidad de lecturas se pueden utilizar para determinar con precisión el nivel de expresión de un gen (Lowe et al. 2017).

Debido a que el RNA-Seq requiere copiar las moléculas de RNA a cDNA antes de secuenciarlas, las plataformas de secuenciación son las mismas para genomas y transcriptomas. Las plataformas de secuenciación más utilizadas son: 454, de Roche, Illumina, de Illumina; SOLiD y Ion Torrent, de Thermo Fisher Scientific, siendo la

plataforma Illumina la más empleada y la utilizada en el presente trabajo. Esta plataforma genera lecturas de 50 a 300 pb, puede secuenciar hasta 900 Gpb por corrida y su precisión es de 99.9 % por lectura (Liu et al. 2012)

### **2.3.2. Análisis bioinformático de expresión diferencial de genes**

El análisis de los resultados de RNA-Seq consiste en cuatro pasos de análisis fundamentales, cuando existe un genoma de referencia para el organismo estudiado. En primer lugar, los datos sin procesar se convierten en secuencias cortas de lectura, que posteriormente se alinean contra el genoma o transcriptoma de referencia, luego las lecturas mapeadas se cuantifican para calcular el nivel de expresión de los genes mediante algoritmos, y por último, la expresión diferencial de genes se determina con el uso de programas bioinformáticos que integran pruebas estadísticas basadas en modelos de distribución (Mutz et al. 2013). Existen herramientas que permiten realizar las etapas del análisis bioinformático descritas previamente. Como ejemplo, en este trabajo se emplearon los programas TopHat2 (Kim et al. 2013) y Cufflinks (Trapnell et al. 2010) que se encuentran disponibles en la plataforma bioinformática Galaxy (Afgan et al. 2016).

### **2.3.3. Análisis de ontología de genes**

El avance de las tecnologías experimentales empleadas en las ciencias biológicas ha permitido la generación de datos a gran escala, los cuales deben analizarse y compararse con resultados previos para generar información relevante. Uno de los problemas principales al momento de comparar resultados consiste en encontrar información relevante en las bases de datos, debido a la falta de estandarización de términos y a la diversidad de interfaces y lenguajes. Esto genera la necesidad de establecer un nivel de estandarización en la comunidad científica para manejar y utilizar la información, lo cual se puede lograr empleando ontologías. Una ontología, además de ser un sistema de clasificación, tiene cada una de sus categorías, clases, términos o conceptos definidos por una serie de aserciones que los conectan a otros términos (Viera et al. 2010).

En 1998, representantes de las bases de datos de tres organismos modelo -Drosophila (FlyBase), Saccharomyces Genome Database y Mouse Genome Database- fundaron el Consorcio de Ontología de Genes (GOC), un esfuerzo colaborativo

para desarrollar vocabularios biológicos aplicables a todas las especies, con el propósito de anotar los productos génicos de forma consistente entre las diferentes bases de datos (Ashburner et al. 2000). Un término de ontología de genes (GO) es una categoría que puede describir a un gen. Los genes se asocian con tantos términos como sea necesario, siempre que éstos reflejen lo que realmente se conoce acerca del gen. Los términos descriptivos para los genes se encuentran en una de las siguientes tres ontologías. La ontología de proceso biológico incluye generalmente transformaciones químicas o físicas que ocurren por la acción de un conjunto de funciones moleculares organizadas. La ontología de función molecular describe actividades que ocurren a nivel molecular, y sus términos representan a las actividades y no a las entidades que llevan a cabo las acciones. La ontología de componente celular se refiere al espacio celular donde se encuentra el producto génico. Son frecuentes los cambios a la ontología y a las anotaciones, porque las bases de datos de GO se encuentran en actualización constante por parte del GOC y de colaboradores que contribuyen a completar los términos descriptivos de los genes (Huntley et al. 2014).

Una de las aplicaciones más comunes de la ontología de genes consiste en caracterizar conjuntos de genes que se expresan en condiciones experimentales específicas por medio de análisis de enriquecimiento. El análisis de enriquecimiento consiste en determinar el porcentaje de genes de una categoría GO determinada sobre o sub-representada en un conjunto de genes. Existen programas que permiten realizar este análisis, tales como ClueGO (Bindea et al. 2009).

#### **2.3.4. Estudios de expresión diferencial de genes realizados previamente en *P. pastoris***

Los estudios transcriptómicos a gran escala se han usado para comparar la respuesta general de *P. pastoris* a diferentes condiciones de cultivo, empleando microarreglos y recientemente secuenciación masiva por RNA-Seq. Algunas de los estudios que se han realizado empleando RNA-Seq de *P. pastoris* han comparado el crecimiento en diferentes fuentes de carbono, como glicerol y metanol (Liang et al. 2012), la expresión de proteínas en diferentes fases de cultivo en quimiostato (Hesketh et al. 2013), el efecto de microgravedad simulada (Qi et al. 2011), de la concentración de etanol en el medio (Gao

et al. 2016) y de la delección de los factores transcripcionales mig1 y mig2 (Shi et al. 2017). También se han empleado métodos de análisis basados en microarreglos para realizar estudios comparativos de condiciones de cultivo, por ejemplo, del cambio de fuente de carbono de glicerol a metanol (Sauer et al. 2004), de la respuesta a proteínas mal plegadas (Graf et al. 2008), de la influencia de los niveles de oxígeno en cultivos de *P. pastoris* (Baumann et al. 2010), entre especies de levaduras, como *P. pastoris* y *S. cerevisiae* (Baumann et al. 2011), de diferentes velocidades específicas de crecimiento (Rebnegger et al. 2014) y de los cambios que presenta la regulación del metabolismo aerobio cuando se cambia la fuente de carbono de glicerol a metanol (Zhang et al. 2016). Particularmente, en un estudio que empleó RNA-Seq se determinó que *P. pastoris* regula su respuesta genética a nivel transcripcional más que a nivel traduccional (Prielhofer et al. 2015), lo que indica que los estudios de comparación de transcriptomas pueden ser útiles para encontrar elementos genéticos regulatorios específicos para ciertas condiciones de cultivo.

La secuencia determinada del genoma de *P. pastoris* (De Schutter et al. 2009) y el desarrollo de nuevas tecnologías permite el estudio de una genómica funcional mediante el análisis de la expresión global o de múltiples genes de este organismo expuesto a una determinada condición. Esto brinda la posibilidad de realizar estudios que pueden proporcionar una mayor información integrada sobre los genes que participan en un proceso biológico determinado, y permite el estudio de una genómica funcional mediante el análisis de la expresión global o de múltiples genes de este organismo.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Con el avance de la biotecnología se buscan organismos capaces de utilizar residuos para producir metabolitos de utilidad para el ser humano. Entre estos residuos se encuentra el lactosuero, subproducto de la industria de lácteos, el cual es considerado como potencial contaminante y representa una fuente de carbono aprovechable. Se estima que la producción mundial anual de lactosuero llega a ser de 145 millones de toneladas, de las cuales 6 millones son de lactosa. En México, se producen cerca de un millón de toneladas de lactosuero, equivalente a 50 mil toneladas de lactosa. En la búsqueda del aprovechamiento de esta fuente de carbono, se han generado cepas de la levadura *P. pastoris* capaces de hidrolizar y permear lactosa para emplearla como fuente de carbono. Se requiere conocer cómo se ve afectado el metabolismo de dichas cepas cuando crecen en lactosa como única fuente de carbono, y si el uso de esta fuente de carbono tiene efecto en la expresión de proteínas recombinantes bajo el control de ciertos promotores.

Existen varios aspectos que justifican el proyecto. En el aspecto científico, se busca evaluar el estado metabólico de una cepa modificada para utilizar una fuente de carbono que normalmente no aprovecharía, ayudando a conocer la influencia de la fuente de carbono y la factibilidad de su uso en la producción de proteínas recombinantes en el microorganismo. En el aspecto económico, se aportaría conocimiento a una estrategia que busca usar un residuo como una potencial fuente de carbono económica para producir proteínas recombinantes de interés. En cuanto al rubro social y ambiental, esta estrategia permitiría aprovechar un subproducto generado por algunas empresas, lo cual probablemente reduciría los costos de su almacenamiento y proporcionaría el inicio de una solución para disminuir el impacto ambiental que tendría el no poder deshacerse adecuadamente del residuo.

Actualmente no existen estudios metabólicos ni de transcriptomas previos de cepas de *P. pastoris* modificadas para utilizar lactosa como fuente de carbono y que además expresen otras proteínas heterólogas. El estudio permitiría correlacionar el efecto de lactosa con cambios en la expresión de génica, y podría llegar a dar explicaciones del cambio de los niveles de expresión relacionadas con el uso de ciertos promotores y fuentes de carbono.



## 4. HIPÓTESIS

El empleo de lactosa como fuente de carbono y generación de biomasa por parte de cepas de *Pichia pastoris* modificadas genéticamente para expresar genes de forma constitutiva que permitan emplear la lactosa, aunado a las condiciones de cultivo, afectan de forma diferencial los niveles de expresión de genes heterólogos regulados por el promotor *AOX1* y otros genes relacionados con el metabolismo de esta levadura.

## 5. OBJETIVO DEL TRABAJO

### 5.1. Objetivo general

Evaluar el impacto de la lactosa y otras fuentes de carbono en el comportamiento metabólico y en la producción de proteínas heterólogas reguladas por los promotores *AOXI* y *GAP* y dos genes del metabolismo de metanol en cepas de *Pichia pastoris* modificadas genéticamente para utilizar lactosa como fuente de carbono de forma intracelular y extracelular.

### 5.2. Objetivos particulares

- Evaluar el comportamiento metabólico y analizar los perfiles transcripcionales de las cepas KM71LAC412 y una cepa control cultivadas en lactosa, glucosa, glicerol y lactosa con metanol.
- Evaluar el comportamiento metabólico de las cepas KM71FTEII-LAC, KM71HGH22K-LAC y sus respectivas cepas control cultivadas en lactosa, glucosa, glicerol y lactosa con metanol; y el efecto de la lactosa y el glicerol sobre la expresión de genes regulados por los promotores *AOXI* y *GAP* y dos genes del metabolismo de metanol mediante RT-qPCR.
- Construir una cepa de *P. pastoris* que exprese una  $\beta$ -galactosidasa extracelular funcional y caracterizar su comportamiento metabólico.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Material biológico empleado

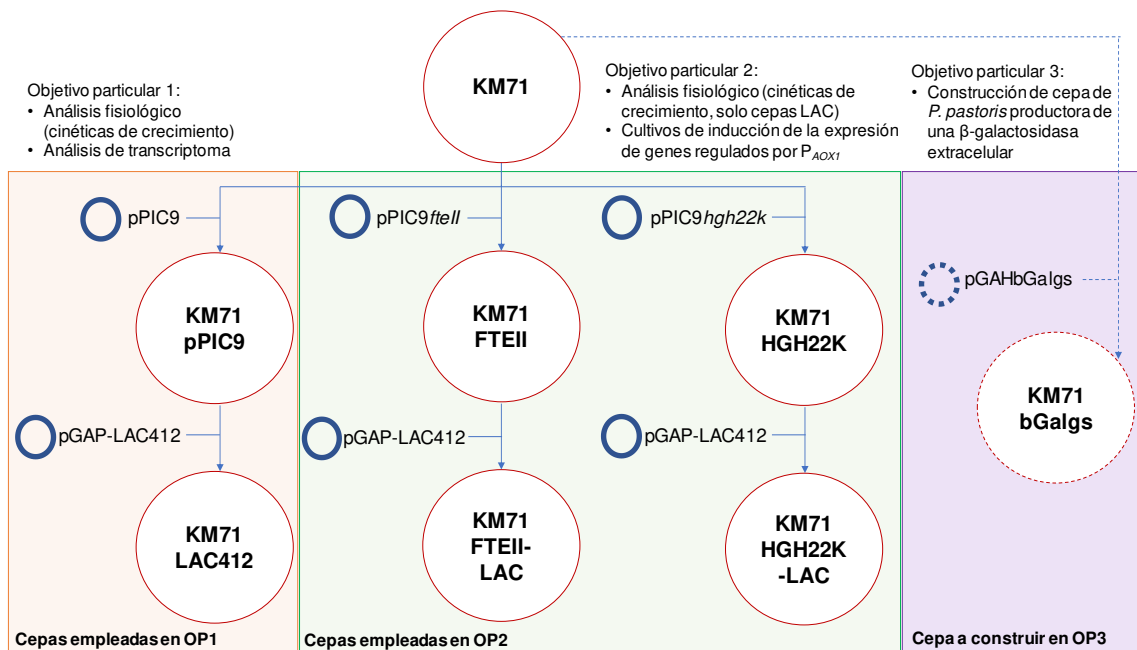
Para los análisis descritos en el presente trabajo, se emplearon cepas recombinantes de *P. pastoris* construidas previamente en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, las cuales se describen en la sección de antecedentes (2.1.3.2.1) y a continuación.

Las cepas de *P. pastoris* KM71pPIC9 y KM71LAC412, empleadas en los análisis transcripcionales a nivel global de objetivo particular 1, derivan de la cepa KM71 (Invitrogen 2014) transformada con los plásmidos pPIC9 (Invitrogen 2014) o pGAP-LAC412 (Castillo-Galván, tesis por publicar), respectivamente. El plásmido pGAP-LAC412 fue construido al insertar en el plásmido pGAPZ $\alpha$ A (Invitrogen, Cat. V20020) una secuencia sintética que codifica para una  $\beta$ -galactosidasa intracelular y una lactosa permeasa de *K. lactis* modificadas con codones preferenciales para *P. pastoris* y bajo la regulación del promotor constitutivo *GAP*. La secuencia del plásmido pGAP-LAC412 se muestra en el **Anexo 2**.

Las cepa KM71FTEII produce y secreta al medio de cultivo una fitasa termoestable con estructura de hélice, denominada FTEII (Viader-Salvadó et al. 2010). La cepa KM71FTEII-LAC deriva de la cepa KM71FTEII modificada con el vector pGAP-LAC412, por lo cual produce además una  $\beta$ -galactosidasa intracelular y una lactosa permeasa de forma constitutiva. La clona de KM71FTEII-LAC empleada en el presente trabajo fue la clona 1 obtenida en el grupo de trabajo, ya que ésta fue la que tuvo el mayor número de copias (aproximadamente 25) del vector pGAP-LAC412 (Herrera-Estala 2015). El gen heterólogo *FTEII* de estas cepas se encuentra bajo la regulación del promotor *AOX1* inducible con metanol; y los genes *LAC4* ( $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*) y *LAC12* (permeasa de lactosa de *K. lactis*) se expresan utilizando el promotor *GAP*, que es constitutivo. Estas cepas recombinantes fueron caracterizadas mediante PCR en el grupo de trabajo, mostrando la integración de los genes *LAC4* y *LAC12* en el genoma de la levadura (Herrera-Estala 2015).

Las cepas KM71HGH22K y KM71HGH22K-LAC, generadas en el grupo de trabajo, se encuentran transformadas con la secuencia codificante de la hormona del crecimiento humana de 22 kDa modificada con codones preferenciales para *P. pastoris* y regulada por el promotor *AOX1*. La cepa KM71HGH22K referida en este trabajo corresponde a la clona 12 de la cepa KM71hGH-22Ks (Balderas-Cisneros 2016) La cepa KM71HGH22K-LAC deriva de la cepa KM71HGH22K, al transformar esta última con el vector pGAP-LAC412.

El origen de las cepas mencionadas previamente, así como el objetivo para el cual se empleó cada una se resume en la **Figura 4**.



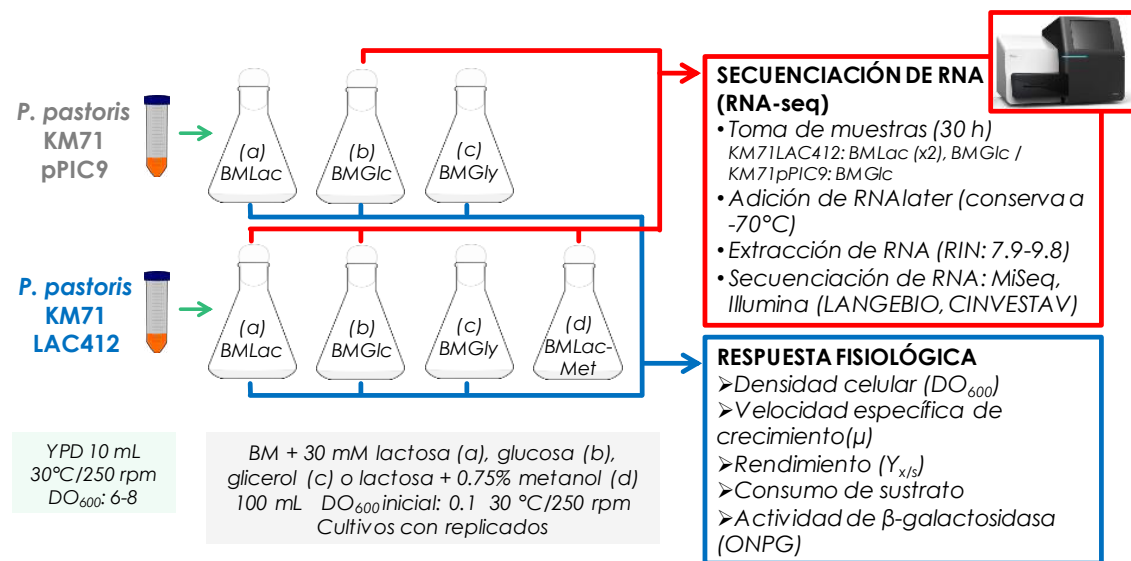
**Figura 4.** Origen de las cepas de *P. pastoris* y análisis realizados con éstas en el presente trabajo. Los círculos de mayor tamaño representan a las cepas, los círculos de menor tamaño, a los vectores utilizados para su modificación genética. Las líneas punteadas indican cepas y vectores construidos en el presente trabajo. OP: objetivo particular.

El resto de los materiales y equipos empleados se describe en el apartado metodológico correspondiente.

## 6.2. OBJETIVO 1. Evaluación del comportamiento metabólico y análisis de los perfiles transcripcionales de las cepas KM71LAC412 y una cepa control cultivadas en lactosa, glucosa, glicerol y lactosa con metanol.

### 6.2.1. Estrategia general

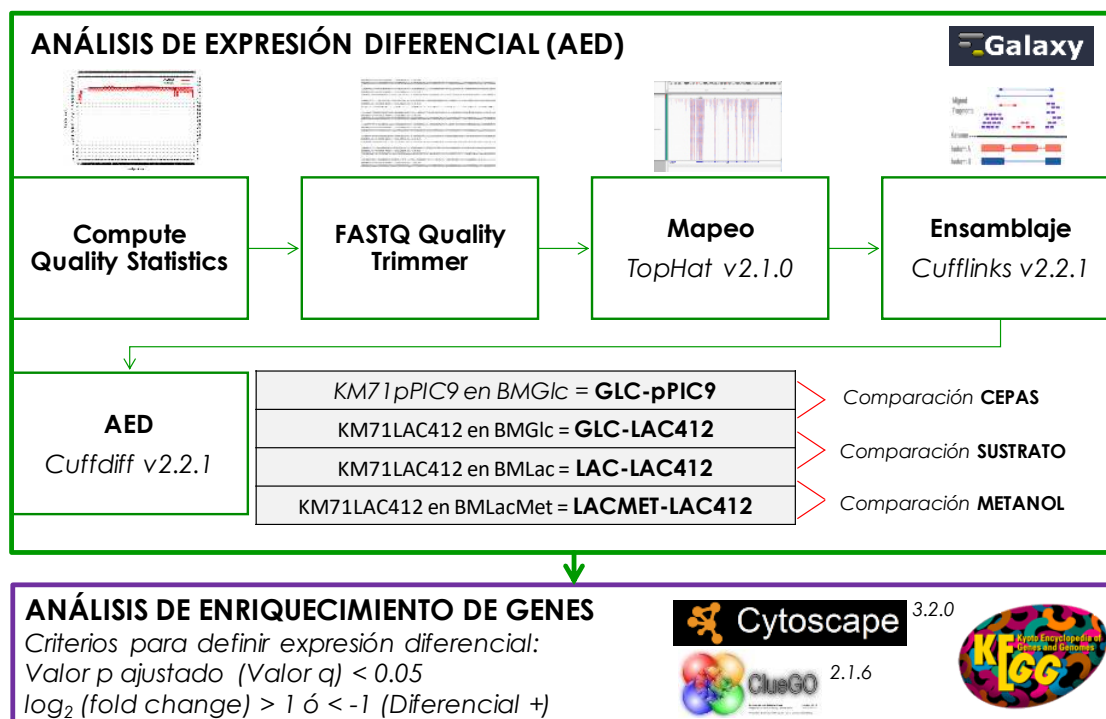
Para cumplir el primer objetivo particular, que consistió en la evaluación del comportamiento metabólico y el análisis de los perfiles transcripcionales de la cepa KM71LAC412 y una cepa control cultivadas en lactosa, glucosa y glicerol, se diseñaron estrategias de cultivo para el empleo de lactosa como fuente de carbono y generación de biomasa. Se evaluó el crecimiento en distintas fuentes de carbono de las cepas previamente mencionadas en el apartado 6.1 mediante cultivos por triplicado en medio suplementado con glucosa, glicerol, lactosa o lactosa con metanol, para obtener muestras a diferentes tiempos de cultivo y evaluar los siguientes parámetros: densidad celular, velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), rendimiento de biomasa por sustrato ( $Y_{x/s}$ ), consumo de la fuente de carbono y actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Además, se obtuvieron muestras de los cultivos para extraer RNA y realizar análisis de transcripción global mediante RNA-Seq. Se muestra un diagrama de los cultivos realizados y los parámetros evaluados en la **Figura 5**.



**Figura 5.** Estrategia experimental del primer objetivo particular: cultivos para la evaluación de parámetros fisiológicos.

Una vez obtenidas las secuencias, se llevó a cabo un análisis bioinformático en el cual se compararon los datos de los transcriptomas obtenidos de las siguientes cepas en

diferentes medios de cultivo: KM71LAC412 en BMLac, en BMLacMet y en BMGlc, y KM71pPIC9 en BMGlc. Se realizaron tres comparaciones, que se muestran en la **Figura 6**, de las cuales se obtuvieron los datos de expresión diferencial de los genes en cada una. Con los datos obtenidos, se realizaron análisis de ontología de genes para determinar los procesos celulares y metabólicos sobrerrepresentados en los genes sobre y sub-expresados. Además, se evaluó el estado de expresión de los genes del metabolismo central, de transportadores de carbohidratos y de la vía de utilización del metanol.



**Figura 6.** Estrategia experimental del primer objetivo particular: análisis de expresión diferencial de genes.

## 6.2.2. Evaluación de parámetros fisiológicos de las cepas de *P. pastoris* KM71LAC412 y KM71pPIC9 cultivadas en medios con lactosa, glucosa o glicerol

### 6.2.2.1. Preparación de inóculos para las cinéticas de crecimiento

Para la reactivación de las cepas a evaluar, se inocularon 10 mL de medio YPD contenidos en un tubo de 50 mL con 100-200  $\mu$ L de un cultivo previo o conserva de la cepa correspondiente de *P. pastoris* con la que se realizaría la cinética: KM71LAC412 o KM71pPIC9. Se incubó el cultivo a 30 °C con una agitación de 250 rpm en una incubadora de piso (MaxQ™ 6000, ThermoFisher Scientific) por aproximadamente 16 h. Transcurrido ese tiempo, se determinó la densidad celular del cultivo por

espectrofotometría a 600 nm de la forma descrita a continuación. En celdas macro de plástico para espectrofotómetro (Brand) se colocaron 2.7 mL de agua bidestilada para las celdas que se usarían para la medición de muestras y 3 mL de agua en la que se usaría como blanco del espectrofotómetro. Se colocaron 300  $\mu$ L del cultivo a cuantificar en las celdas con 2.7 mL de agua. Para la medición de la absorbancia de las muestras se usó un espectrofotómetro (SmartSpec™ 3000, Bio-Rad) de la manera que se describe a continuación. Se encendió el espectrofotómetro y se esperó hasta que el equipo se inicializara, se seleccionó la opción de medición de OD<sub>600</sub>, y se aceptaron los parámetros por defecto. Se colocó la celda con 3 mL de agua bidestilada en el espectrofotómetro y se oprimió el botón Read Blank. Se sustituyó la celda con el blanco por otra celda con la dilución de la muestra, previamente mezclando por inversión la celda. Se oprimió el botón Read Sample y se registró el valor obtenido, el cual se multiplicó por 10 para obtener la densidad óptica a 600 nm del cultivo. Si el valor se encontraba en el rango aproximado de 6 a 8, el cultivo se podía emplear para llevar a cabo las cinéticas de crecimiento, como se describe en las siguientes secciones.

#### **6.2.2.2. Cultivos para la realización de las cinéticas de crecimiento**

Se realizaron cultivos en medios de sales basales suplementados con glicerol (BMGly), glucosa (BMGlc) o lactosa (BMLac) 30 mM y con lactosa 30 mM junto con metanol 0.75 % (BMLacMet). La composición y preparación de los medios mencionados se describe en el **Anexo 1**. En condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar, se prepararon alícuotas de 100 mL de los cuatro medios previamente mencionados en matraces estériles con capacidad de 1 L y tapados con torunda de algodón. Para la inoculación de los medios, se partió de un cultivo de cepa reactivada para inóculo (**6.2.2.1**), realizando previamente los cálculos necesarios para inocular los 100 mL de medio con un volumen de inóculo que permitiera el inicio del cultivo a una DO<sub>600 nm</sub> de 0.1. Dichos cálculos se llevaron a cabo multiplicando el volumen de 100 mL de medio por la DO<sub>600 nm</sub> inicial esperada de 0.1 y dividiendo entre la DO<sub>600 nm</sub> del cultivo que se emplearía como inóculo, obteniendo como resultado el volumen (en mL) del inóculo que se depositaría en el matraz con el medio de cultivo. Se tomó el volumen de inóculo calculado y se depositó en el matraz con medio de cultivo en condiciones de esterilidad.

El matraz se incubó a 30 °C y 250 rpm. Para las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9, las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo en BMGly, BMGlc y BMLac. Para las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC, las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo en BMGly, BMGlc, BMLac y BMLacMet. Los cultivos de cada cepa en cada fuente de carbono designada contaron con al menos tres repeticiones. Se mostró previamente un esquema de la estrategia de este experimento en la **Figura 5**.

### **6.2.2.3. Toma de muestra de los cultivos en las cinéticas de crecimiento**

A partir de los cultivos descritos en la sección **6.2.2.2**, se procedió con la toma de muestra, la cual constó de dos etapas: medición de  $DO_{600\text{ nm}}$  y extracción de una alícuota de cultivo para realizar análisis posteriores. La medición de  $DO_{600\text{ nm}}$  se realizó de forma similar a la descrita en la sección de la generación del inóculo (**6.2.2.1**), con la precaución de agitar el cultivo en el matraz antes de tomar la muestra para la dilución. La extracción de alícuota se llevó a cabo depositando 2 mL de cultivo en un tubo nuevo y estéril de 2 mL, que se centrifugó por 10 min a 6000 rpm y 4 °C, tras lo cual se decantó el sobrenadante en un tubo nuevo de 2 mL. En el caso de las alícuotas que se emplearían para la extracción de RNA, se siguió el procedimiento que se describe en la sección **6.2.3.1**. Las muestras de paquete celular y sobrenadante se rotularon y se almacenaron a -20 °C para análisis subsecuentes. Las muestras de cultivo se extrajeron cada 2 o 4 h en las primeras fases del cultivo, tras lo cual los tiempos de muestreo se ajustaron al crecimiento observado del mismo.

### **6.2.2.4. Determinación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )**

La  $\mu$  de las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9 se calculó de dos maneras. Para las cinéticas de crecimiento en BMGlc y BMGly, y las cinéticas de las primeras fases de crecimiento de BMLac, se realizó una gráfica con el logaritmo natural de la densidad celular (en gDCW/L) en el eje de las ordenadas y el tiempo de muestreo (en h) en el eje de las abscisas, tras lo cual se obtuvo la pendiente de la recta en el segmento de la gráfica con mayor ajuste lineal (mayor valor del coeficiente de determinación [ $r^2$ ]), empleando el programa Microsoft Excel 365. Para las cinéticas de crecimiento en BMLac, la  $\mu$  se calculó ajustando los datos de densidad celular (en gDCW/L) y tiempo al modelo de la ecuación logística, también llamada de Verlhurst-Pearl. Con ésta, se ajustaron los datos



de peso seco obtenidos al modelo  $y = a/(1+(b*\exp(-c*x)))$ , donde “y” es el valor de la densidad celular (en gDCW/L), “x” es el tiempo (en h), “a” corresponde al valor de densidad celular máximo teórico ( $X_{max}$ , en gDCW/L), “b” es un coeficiente que corresponde a la diferencia de  $X_{max}$  con la densidad celular inicial, dividida entre la densidad celular inicial, y “c” es la  $\mu$  (en  $h^{-1}$ ). Este modelo resulta de la **Ecuación 1** (López et al. 2009), donde  $X(t)$  es la densidad celular a determinado tiempo,  $X_{max}$  es la densidad celular máxima,  $X_0$  es la densidad celular inicial (todas las anteriores en gDCW/L),  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento (en  $h^{-1}$ ) y  $t$  es el tiempo (en h). El ajuste del modelo se realizó con el programa QtiPlot 0.9.8.9 (<http://www.qtiplot.com/>) en su versión para sistemas operativos basados en Linux.

$$X(t) = \frac{X_{max}}{\left[1 + \frac{X_{max} - X_0}{X_0}\right] e^{-\mu t}}$$

**Ecuación 1.** Modelo para el crecimiento de biomasa basado en la ecuación logística.

#### **6.2.2.5. Determinación del rendimiento de biomasa por unidad de sustrato ( $Y_{x/s}$ )**

Para la determinación del  $Y_{x/s}$  se utilizó el valor máximo de biomasa alcanzado en el cultivo, en peso celular seco por litro (gDCW/L). El peso seco se determinó a partir del valor de  $DO_{600\text{ nm}}$  máximo alcanzado en los cultivos y se multiplicó por 0.23, que representa un factor de conversión determinado previamente en el grupo de trabajo. El valor obtenido se dividió entre las unidades (g o mol) de sustrato inicial por litro.

#### **6.2.2.6. Ensayo para determinación de lactosa en sobrenadante**

El análisis de determinación de lactosa en sobrenadante se realizó mediante una reacción colorimétrica en la que las muestras con lactosa, al reaccionar con metilamina en una solución alcalina caliente, desarrollan una coloración magenta (Nickerson et al. 1975). La composición de los reactivos se describe en el **Anexo 1**. Para la preparación de los estándares empleados en la determinación se realizó una mezcla 5:2 de BMLac (30 mM o 1 %) y NaOH 1M, respectivamente, la cual se consideró como el estándar de lactosa

1 %. Debido a que la curva de calibración del ensayo se realizaría por duplicado, se mezclaron 1250  $\mu\text{L}$  BMLac y 500  $\mu\text{L}$  NaOH 1 M, resultando en 1750  $\mu\text{L}$  totales. Se diluyó el estándar de lactosa 1 % con solución de NaOH-KCl para obtener estándares de concentración de 0.75, 0.50 y 0.25 %, mezclando los volúmenes indicados en la **Tabla 3**. Los estándares se prepararon justo antes del ensayo para evitar que la solución se tornara amarilla debido a su degradación.

**Tabla 3.** Preparación de estándares para recta de calibración de lactosa.

Concentración del estándar	Estándar de lactosa 1 % ( $\mu\text{L}$ )	Solución NaOH-KCl ( $\mu\text{L}$ )
1.00 %	700	0
0.75 %	525	175
0.50 %	350	350
0.25 %	175	525
TOTAL	1750	-

El pretratamiento de las muestras analizadas se realizó elaborando una mezcla de 5:2 de muestra y NaOH 1M, respectivamente. Ya que el ensayo se realizó por duplicado, se mezclaron 450  $\mu\text{L}$  muestra y 180  $\mu\text{L}$  NaOH 1 M, resultando en 630  $\mu\text{L}$  totales. Las muestras se pretrataron justo antes de realizar el ensayo para evitar su degradación.

El ensayo se realizó como se describirá a continuación. En un tubo de 2 mL se mezclaron 300  $\mu\text{L}$  de estándar o muestra pretratados, 700  $\mu\text{L}$  de solución NaOH-KCl, 30  $\mu\text{L}$  de metilamina-HCl al 5 % y 50  $\mu\text{L}$  de sulfito de sodio al 1 %, en ese orden. La mezcla anterior se calentó por 30 min a 60 °C en un bloque de calentamiento (Thermomixer R, Eppendorf) e inmediatamente se enfrió en hielo. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 540 nm de las muestras y estándares inmediatamente después del ensayo, ya que el color de la reacción desaparece con el tiempo.

#### **6.2.2.7. Determinación la velocidad específica de consumo de lactosa**

La velocidad específica de consumo de una fuente de carbono indica la eficiencia celular de la velocidad de consumo de la fuente de carbono. La determinación de la velocidad específica de consumo de lactosa se obtuvo a partir del ajuste a una función polinómica de la relación lactosa consumida del medio (en mmol/L o g/L) contra tiempo (en h), y posterior derivada en cada uno de los puntos de la función obtenida, para de esta forma obtener la velocidad de consumo a un tiempo determinado (mmol/L h o g/L h) y finalmente dividir entre la densidad celular (en gDCW/L) correspondiente a cada tiempo. La velocidad específica de consumo de lactosa fue expresada en mmol/gDCW h o g/gDCW h.

#### **6.2.2.8. Determinación de actividad específica, actividad volumétrica y rendimiento producto biomasa de $\beta$ -galactosidasa**

La determinación de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las muestras se realizó empleando el procedimiento descrito en el manual del kit de expresión de *Pichia* (Invitrogen 2014). Este procedimiento implica varias etapas, descritas en puntos posteriores, entre las que se encuentran la preparación de lisados celulares (descrita en **6.3.3.4**), el ensayo de actividad de  $\beta$ -galactosidasa (descrito en **6.3.3.5**) y la determinación de la concentración de proteínas en la muestra (descrita en **6.3.3.6**).

La determinación de la actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa (en U/mg de proteína intracelular) se realizó como se describe en el apartado **6.3.3.5**. La determinación de la actividad volumétrica se llevó a cabo de la siguiente manera. Se determinó la cantidad de proteínas intracelulares totales obtenida por cada muestra procesada (equivalente a un volumen de 2 mL de muestra), multiplicando la concentración de proteínas en el lisado celular por el volumen de lisado celular obtenido a partir de la muestra. Esta cantidad (en mg) se multiplicó por la actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa y luego se dividió entre dos para calcular la actividad por mL (U/mL). La determinación del rendimiento de producto/biomasa (U/mgDCW) se realizó dividiendo la actividad volumétrica previamente calculada entre la densidad celular (en mgDCW/mL).

### **6.2.3. Análisis de transcriptoma**

#### **6.2.3.1. Toma de muestra para el análisis de transcriptoma**

Para el análisis del transcriptoma se realizaron cultivos como los descritos previamente para las cinéticas de crecimiento (6.2.2.2). Se llevaron a cabo cultivos de las cepas de *P. pastoris* KM71LAC412 en los medios BMGlc, BMLac y BMLacMet y KM71pPIC9 en BMGlc, con una  $DO_{600\text{ nm}}$  inicial de 0.1 e incubados a 30 °C y 250 rpm. A las 30 h del inicio del cultivo se midió la  $DO_{600\text{ nm}}$  y se tomaron 2 mL de muestra de los cultivos. La muestra se centrifugó por 10 min a 6000 rpm y 4 °C y se descartó el sobrenadante. Al paquete celular se le agregaron 500 µL del reactivo RNAlater (Ambion) y se incubó a 4 °C *overnight*. Al día siguiente, la muestra con RNAlater se centrifugó 10 min a 14000 rpm y 4 °C, tras lo cual se decantó el sobrenadante. El paquete celular se almacenó a -20 °C.

#### **6.2.3.2. Aislamiento de RNA**

Para el aislamiento de RNA de las muestras, se empleó principalmente el kit SV Total RNA Isolation System® (Promega, Cat. Z3101) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones descritas en este apartado. La manipulación de la muestra durante el proceso se llevó a cabo dentro de una estación de trabajo para PCR (C.B.S Scientific Co. Mod. P-048-202) con el fin de minimizar la exposición a contaminantes capaces de degradar la muestra. Se emplearon materiales y reactivos nuevos y libres de RNasas. Se emplearon guantes de nitrilo y cubrebocas durante todo el proceso de extracción. Se mantuvo la muestra en hielo mientras no estuviera procesándose para evitar la degradación del RNA.

El paquete celular se resuspendió mediante pipeteo en 90 µL de buffer para liticasa (EDTA 0.1 M pH 7.4, sorbitol 1 M y β-mercaptoetanol 0.1 %) hasta obtener una mezcla homogénea. A continuación, se añadieron 50 U de liticasa (liticasa de *Arthrobacter luteus* L2524 [Sigma-Aldrich©]) (10 µL de liticasa 5 U/µL), se mezcló en vórtex por 10 s y se incubó de 30 a 60 min a 30 °C en bloque de calentamiento (Thermomixer R, Eppendorf) sin agitación, hasta que la solución se tornara clara.

Después de la incubación, se agregaron 75  $\mu\text{L}$  de *RNA Lysis Buffer*, y se mezcló por pipeteo, luego se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de *RNA Dilution Buffer*, se mezcló por inversión y se centrifugó por 10 min a 14000 rpm a 4 °C. El sobrenadante, de color azul, se transfirió por pipeteo (aproximadamente 500  $\mu\text{L}$ ) a un tubo nuevo de 2 mL, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 95 % y se mezcló por pipeteo. La mezcla se transfirió a un cartucho de filtración (columna ensamblada con tubo colector) y se centrifugó 1 min a 14000 rpm y 4 °C. Se descartó el líquido de tubo colector, se volvió a ensamblar el cartucho y se añadieron a la columna 600  $\mu\text{L}$  de *RNA Wash Solution*. Se centrifugó por 1 min a 14000 rpm y 4 °C y se descartó el líquido del tubo colector.

Se preparó la mezcla de incubación para DNasa de la siguiente manera. Se mezclaron 40  $\mu\text{L}$  de *Yellow Core Buffer*, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnCl}_2$  0.09 M y 5  $\mu\text{L}$  de DNasa I resuspendida según las instrucciones del kit. La mezcla se preparó justo antes de emplearse. Se aplicaron 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior a la columna, asegurándose de humedecer por completo la membrana, y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Luego se detuvo la incubación agregando 230  $\mu\text{L}$  de *DNase Stop Solution* a la columna, se centrifugó 1 min a 14000 rpm y 4 °C.

Se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de *RNA Wash Solution* y se centrifugó 1 min a 14000 rpm y 4 °C. Se eliminó el contenido del tubo colector, se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de *RNA Wash Solution* a la columna y se centrifugó 2 min a 14000 rpm y 4 °C. Finalmente, se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas a la membrana, se centrifugó 1 min a 14000 rpm a 4 °C, se colectó el filtrado conteniendo el RNA y se descartó el cartucho de filtración.

### **6.2.3.3. Análisis de la calidad de la preparación de RNA**

La concentración y la calidad de las preparaciones de RNA se determinaron para los análisis subsecuentes. La concentración se determinó por espectrofotometría empleando un nano-espectrofotómetro (NanoPhotometer® Pearl, Implen) como se indica en el apartado **6.2.3.3.1**, en el cual se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de muestra para determinar los valores de absorbancia a 260 y 280 nm y la relación de absorbancia a 260/280 nm. La calidad del RNA se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en buffer de tris-boratos-EDTA (TBE 1X, Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM. La

integridad del DNA se determinó mediante el análisis con el Bioanalizador Agilent 2100 como se describe en el apartado **6.2.3.3.2**, con el que se obtuvo el electroferograma con los picos correspondientes a las bandas de RNA ribosomal 26S y 18S y el número de integridad del RNA (RIN).

Según el análisis al que se someterían, las preparaciones de RNA se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  o  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y otra parte se almacenó en hielo seco para el envío de las muestras al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional.

#### **6.2.3.3.1. Cuantificación de RNA por nano-espectrofotometría**

Para determinar la concentración de las preparaciones de RNA, se utilizó el nano-espectrofotómetro NanoPhotometer® Pearl, Implen. Se ensambló el equipo colocando el NanoPhotometer™ P-Class Submicroliter Cell (base en donde se deposita la muestra) en el hueco del equipo, orientando las ventanas de cristal frente al haz de luz (de derecha a izquierda, indicado con flechas). Se cubrió la base con una tapa (lid) y se encendió el equipo. En la pantalla, se seleccionó del menú la opción “Nanovolume applications” y después la opción RNA. Posteriormente, se colocó 1  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q en el centro de la base, se colocó la lid (generalmente Lid 10, si la concentración resultaba muy alta se cambiaba a Lid 50) y se dejó reposar por 10 s, se retiró la lid de la base y se limpió con papel secante especial. Después se colocó 1  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q, se cubrió con la lid y se presionó el botón *Blank*. El líquido se retiró con papel secante especial y se procedió a realizar las mediciones de las muestras de RNA. Se colocó 1  $\mu\text{L}$  de RNA, se cubrió con la lid y se presionó el botón *Sample*. Se registraron los valores de concentración,  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  medidos por el equipo y se repitió lo mismo para cada muestra. Entre cada medición realizada, el cristal de la base se lavó con 1  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q, dejando reposar durante 10 s y secando con papel secante especial.

#### **6.2.3.3.2. Análisis de las preparaciones de RNA con bioanalizador de microfluidos (Bioanalyzer)**

Para la evaluación de la integridad de las preparaciones de RNA obtenidas previamente, se realizaron análisis de microfluidos empleando el 2100 Bioanalyzer (Agilent) y el kit Agilent RNA 6000 Nano Kit. Este equipo permite obtener información

sobre el tamaño molecular, integridad y concentración de ácidos nucleicos de manera automatizada en un formato digital, en base a geles de electroforesis en nano chips.

Se ensambló la estación de preparación del nano chip de RNA (*chip priming station*), reemplazando la jeringa utilizada anteriormente por una nueva y ajustando tanto la palanca de la base en la posición adecuada (posición C para el nano chip de RNA) como el clip para sostener la jeringa (posición superior).

Previamente se preparó el marcador de RNA empleado (*ladder*), el cual se desnaturalizó en un bloque térmico durante 2 min a 70 °C, se alicuotó y se almacenó a -70 °C. El colorante incluido en el kit se equilibró a temperatura ambiente por 30 min. Se añadieron 65 µL de RNA 6000 Nano Gel Matrix previamente filtrado (se filtraron 550 µL por 10 min a 14000 rpm a temperatura ambiente, se distribuyeron en alícuotas de 65 µL y se almacenaron a 4 °C) a un tubo de 2 mL libre de RNAsas. Se mezcló del colorante en el vórtex, se añadió 1 µL de colorante a los 65 µL de gel y se mezcló con vórtex. Se centrifugó la mezcla anterior por 10 min a 14000 rpm y temperatura ambiente. Se colocó el nano chip de RNA en la *chip priming station* (con la jeringa ensamblada). Se añadieron 9 µL de mezcla gel-colorante al pozo marcado con G. Se colocó el émbolo de la jeringa en 1 mL, se cerró la tapa de la estación y a continuación se presionó el émbolo de la jeringa y se sujetó con el clip por 30 s. Se liberó el clip, y transcurridos 5 s, se estiró el émbolo de la jeringa a 1 mL. Se abrió la tapa de la estación y se colocaron 9 µL de mezcla gel-colorante en cada uno de los demás pozos marcados con Gs. Se pipetearon 5 µL de nano marcador RNA 6000 en cada uno de los 12 pozos de muestra y en el de ladder, usando una puntilla nueva para cada pozo. Por último, se colocó 1 µL de ladder en el pozo de ladder, 1 µL de muestra de RNA en su respectivo pozo de muestra, y 1 µL de nano marcador RNA 6000 en caso de quedar algún pozo sin muestra.

Antes de colocar el chip en el bioanalizador, se limpiaron los electrodos del aparato con el chip de limpieza incluido en el kit relleno con H<sub>2</sub>O DEPC. El proceso de limpieza se realizó entre el procesamiento de cada chip y al terminar de usar el bioanalizador. Se colocó el chip en el equipo IKA® MS 3 Vortexer por 1 minuto a 2400 rpm, y posteriormente se colocó el chip en el bioanalizador y se inició el programa 2100 Expert de Agilent. Se analizó el chip con el programa RNA de procariotas nano, debido a que

presenta un mejor ajuste para el cálculo del número de integridad de RNA (RIN) de *P. pastoris*, a pesar de ser para análisis de RNA de procariotas. Una vez finalizado el análisis, se registraron las concentraciones de RNA y el RIN para cada una de las muestras analizadas.

#### **6.2.3.4. Análisis bioinformáticos de archivos de transcriptomas para obtener datos de expresión diferencial de genes**

##### **6.2.3.4.1. Obtención y modificación del genoma de referencia y del archivo de anotaciones empleado en el mapeo y ensamblaje de los transcritos**

Para el mapeo y ensamblaje de las lecturas se utilizó un genoma de referencia de *P. pastoris* modificado con las secuencias de los vectores empleados para la generación de las cepas de *P. pastoris* analizadas, la obtención de dicho genoma modificado se describe a continuación. Las cepas empleadas en el análisis provienen de la transformación de la cepa de *P. pastoris* KM71, sin embargo, no se encontró disponible la secuencia del genoma de esta cepa en específico. Por lo tanto, se emplearon las secuencias del genoma de la cepa más cercana, que es *P. pastoris* (*K. phaffii*) GS115, las cuales se encuentran disponibles en la sección Genome del National Center for Biotechnology Information (NCBI) bajo el número de ensamblaje GCA\_000027005.1 (De Schutter et al. 2009). Dichas secuencias comprenden los cuatro cromosomas principales, con los identificadores FN392319.1, FN392320.1, FN392321.1 y FN392322.1 para los cromosomas 1, 2, 3 y 4, respectivamente; además de las secuencias con los identificadores FN392323.1, FN392324.1 y FN392325.1, que corresponden a los contigs 34 y 157 y a la secuencia del DNA ribosomal, respectivamente. Estas secuencias también se encuentran en la página <https://bioinformatics.psb.ugent.be/gdb/pichia/> en el archivo “Ref201010.fa”. También se incluyó la secuencia del DNA mitocondrial de la cepa de *P. pastoris* (*Komagataella phaffii*) CBS 7435, con el número de ensamblaje GCA\_000223565.1 (Küberl et al. 2011) y el identificador NC\_015384.1 de dicha secuencia. En el archivo de genoma de referencia se incluyeron además las secuencias de los plásmidos pPIC9FTEII y pGAP-LAC412. Por último, dado que la cepa *P. pastoris* KM71 posee una inserción que interrumpe el gen de la enzima alcohol oxidasa 1 (*AOX1*, PAS\_chr4\_0821), se incluyó aparte la secuencia del gen *AOX1* modificada, que se denominará “*aox1::ARG4*”. Esta última fue ensamblada a partir de las lecturas no



mapeadas del transcriptoma (en un análisis preliminar) como se describe en el **Anexo 2**, y se verificó por PCR (**6.2.3.4.2**, **7.1.2.2**). Además, en la secuencia del cromosoma 4 de referencia, se sustituyó la secuencia del gen *AOX1* por adeninas para no causar conflicto al momento del alineamiento.

El archivo de anotaciones en formato *Gene transfer format* (.gtf) contiene la posición en el genoma de algunas características de interés. En este caso, el .gtf contenía la ubicación de los exones. Este archivo se generó a partir de los archivos de anotaciones de los genomas de referencia, los cuales se encuentran en los servidores del NCBI ([ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/027/005/GCF\\_000027005.1\\_ASM2700v1/GCF\\_000027005.1\\_ASM2700v1\\_genomic.gff.gz](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/027/005/GCF_000027005.1_ASM2700v1/GCF_000027005.1_ASM2700v1_genomic.gff.gz) y [ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCA/000/223/565/GCA\\_000223565.1\\_PicPas\\_Mar2011/GCA\\_000223565.1\\_PicPas\\_Mar2011\\_genomic.gff.gz](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCA/000/223/565/GCA_000223565.1_PicPas_Mar2011/GCA_000223565.1_PicPas_Mar2011_genomic.gff.gz)). Los archivos descargados se encontraban en formato *General feature format* (.gff), por los que se modificaron en Microsoft Excel para obtener solamente los datos de anotación de los exones. El archivo .gtf generado se complementó con los datos del archivo “pichia\_format.gtf” obtenido del sitio <https://bioinformatics.psb.ugent.be/gdb/pichia/>. También se anotaron los datos de los genes de los plásmidos pPIC9FTEII (*HIS4*, AmpR, factor alfa y *FTEII*) y pGAP-LAC412 (*LAC4*, *LAC12* y *sh\_ble*), y de la secuencia del gen *AOX1* de *P. pastoris* KM71 (región *aox1::ARG4*).

#### **6.2.3.4.2. Verificación por PCR de la región *aox1::ARG4* incluida en el genoma de referencia**

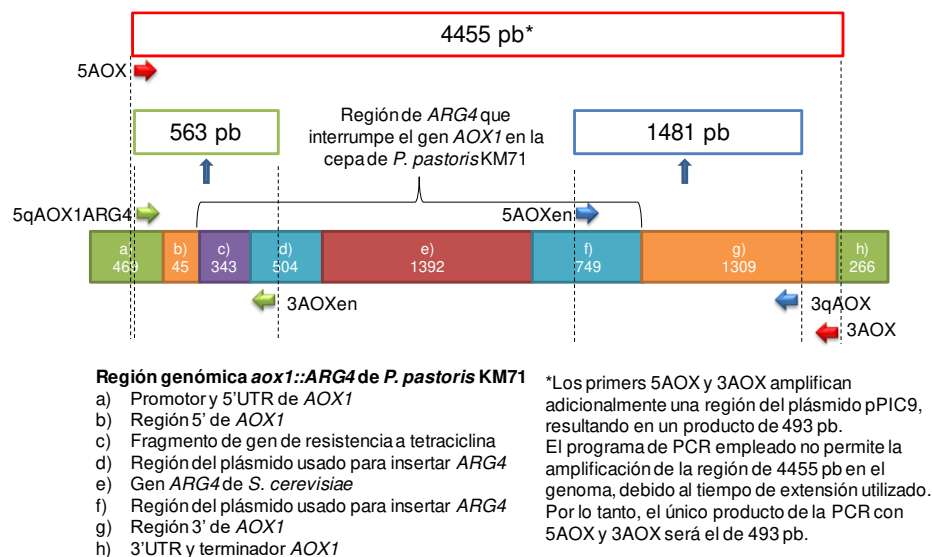
Se diseñaron oligonucleótidos para verificar el tamaño de las regiones predichas en la secuencia ensamblada de *aox1::ARG4*. Los oligonucleótidos se diseñaron al mismo tiempo que los que se emplearían para el análisis por qPCR de la transcripción de la región *aox1::ARG4* (secuencia regulada por el promotor *AOX1* nativo del genoma de *P. pastoris*), por lo que el proceso empleado para su diseño se describe en el apartado **6.3.4.6.1**. Los oligonucleótidos generados, designados como 5qAOX1ARG4, 5AOXen y 3AOXen, se emplearon entre ellos y en conjunto con otros oligonucleótidos disponibles previamente en el lugar de trabajo (5AOX, 3AOX y 3qAOX) para caracterizar por PCR la región *aox1::ARG4* predicha por métodos bioinformáticos (descrita en el **Anexo 2**). Las

secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la **Tabla 4**. Se emplearon los pares de oligonucleótidos 5qAOX1ARG4 y 3AOXen, y 5AOXen y 3qAOX, que resultan en productos amplificados de 563 y 1481 pb, respectivamente, y el par de oligonucleótidos 5AOX y 3AOX como control positivo. El esquema de amplificación dentro de la región *aox1::ARG4* se muestra en la **Figura 7**.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos empleados en la verificación de la región *aox1::ARG4* por PCR

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
5qAOX1ARG4	AATTGCGACTGGTCCAATTGAC
5AOXen	GGAGCCTTGGCAGATCAGGT
3AOXen	AGGGCCTCGTGAATGTCTGA
5AOX*	GACTGGTCCAATTGACAAGC
3AOX*	GCAAATGGCATTCTGACATCC
3qAOX*	TCTCAGTGTGCTCACGAATGT

\*Oligonucleótidos disponibles previamente en el lugar de trabajo



**Figura 7.** Esquema de amplificación por PCR de la región *aox1::ARG4*.

La mezcla de reacción para PCR se realizó con el volumen de los reactivos mostrados en la **Tabla 5**, empleando un volumen de cuatro reacciones. No se añadieron a la mezcla los oligonucleótidos ni el DNA. La mezcla se distribuyó en cuatro alícuotas de 19  $\mu$ L en tubos de 0.2 mL nuevos y estériles, a las cuales se le añadieron 2.5  $\mu$ L de cada uno de los oligonucleótidos según se describe a continuación: a los tubos 1 y 2, 5AOX y 3AOX; al tubo 3, 5AOXen y 3qAOX; y al tubo 4, 5qAOXARG4 y 3AOXen. Finalmente, se añadió 1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q al tubo 1 como control negativo, y los tubos 2 a 4 se les añadió 1  $\mu$ L de una preparación de *P. pastoris* KM71pPIC9, consistente de una colonia

de dicha cepa suspendida en 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q, a la que se le añadió 1  $\mu\text{L}$  de liticasa (liticasa de *Arthrobacter luteus* L2524 [Sigma-Aldrich©], 5 U/ $\mu\text{L}$ ) y se incubó por 1 h a 30 °C. Los tubos con las reacciones se introdujeron al termociclador, con el programa que se muestra en la **Tabla 6**, y posteriormente se analizaron por electroforesis.

**Tabla 5.** Volúmenes de reactivos para PCR para verificación de la región *aox1::ARG4*.

Reactivo	Volumen x1 ( $\mu\text{L}$ )	Volumen x4 ( $\mu\text{L}$ )
$\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q	13.3	53.2
Buffer Green GoTaq 5X (Promega)	5.0	20.0
Oligonucleótido 1 (5 $\mu\text{M}$ )	0.5	2.0
Oligonucleótido 2 (5 $\mu\text{M}$ )	2.5	_*
dNTP (Bioline) (10 mM)	2.5	_*
GoTaq DNA Polimerasa (Promega) (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.2	0.8
DNA	1	_**
Volumen total de reacción	25	

\*Reacciones 1 y 2: oligonucleótidos 5AOX y 3AOX, reacción 3: 5AOXen y 3qAOX, reacción 4: 5qAOXARG4 y 3AOXen.

\*\*Se empleó  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q en la reacción 1 (control negativo) y una preparación de *P. pastoris* KM71pPIC9 tratada con liticasa en las reacciones 2 a 4.

**Tabla 6.** Programa de termociclador para PCR de verificación de región *aox1::ARG4*.

Ciclos	Temperatura (°C)	Duración (min)
1	94.0	2:00
	94.0	1:00
30	50.0	1:00
	72.0	2:00
1	72.0	10:00

#### 6.2.3.4.3. Obtención, conversión y análisis de calidad de los archivos FASTQ

Se obtuvieron 5 conjuntos (con dos archivos de lecturas por conjunto: *forward* y *reverse*) de transcriptomas en formato FASTQ Illumina, generados a partir de cultivos a las 30 h de las siguientes cepas en distintas fuentes de carbono: cepa KM71pPIC cultivada en BMGlc (GLC-pPIC9) y cepa KM71LAC412 cultivada en BMGlc (GLC-LAC412), en BMLac (LAC-Lac412, 2 replicados) y en BMLacMet (LACMET-LAC412). Los archivos FASTQ se exportaron a la plataforma Galaxy (Afgan et al. 2016), en donde se analizarían con los programas descritos en los apartados siguientes. Se emplearon los programas FASTQ Groomer, FastQC:ReadQC y FASTQ Quality Trimming (Blankenberg et al. 2010) para los archivos a formato FASTQ Sanger, evaluar la calidad de las lecturas y recortar las secuencias eliminando nucleótidos de baja calidad, respectivamente.

Debido a que el formato de las lecturas obtenidas era distinto al necesario para el resto de los análisis, se usó la herramienta FASTQ Groomer 1.0.4 (Galaxy Tool ID: toolshed.g2.bx.psu.edu/repos/devteam/fastq\_groomer/fastq\_groomer/1.0.4) para su conversión a formato FASTQ Sanger. Los parámetros usados se muestran en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Parámetros empleados en FASTQ Groomer.

Parámetro de entrada	Valor
File to groom	<b>(Archivo FASTQ a procesar)</b>
Input FASTQ quality scores type	Sanger & Illumina 1.8+
Advanced Options	advanced
Output FASTQ quality scores type	Sanger (recommended)
Force Quality Score encoding	ASCII
Summarize input data	Summarize Input

Las lecturas de los transcriptomas con baja calidad se recortaron de los archivos de lecturas usando la herramienta FASTQ Quality Trimmer 1.0.0 (Galaxy Tool ID: toolshed.g2.bx.psu.edu/repos/devteam/fastq\_trimmer\_by\_quality/fastq\_quality\_trimmer/1.0.0). Se indicó que las lecturas tuvieran un score de calidad (puntaje Phred) mayor o igual a 20. Los parámetros de entrada usados se muestran en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Parámetros empleados en FASTQ Quality Trimmer.

Parámetro de entrada	Valor
FASTQ File	<b>(Archivo FASTQ a procesar)</b>
Keep reads with zero length	False
Trim ends	5' and 3'
Window size	1
Step Size	1
Maximum number of bases to exclude from the window during aggregation	0
Aggregate action for window	min score
Trim until aggregate score is	>=
Quality Score	20.0

Los archivos FASTQ resultantes se evaluaron con el programa FASTQ Summary Statistics (Blankenberg et al. 2010) mediante un gráfico de tipo boxplot de los puntajes de calidad basados en la posición del nucleótido en la secuencia.

#### 6.2.3.4.4. Mapeo de las lecturas con TopHat2

Una vez procesados los archivos FASTQ, se procedió al alineamiento de las lecturas por medio de la herramienta TopHat2 v2.1.0 (Galaxy Tool ID: toolshed.g2.bx.psu.edu/repos/devteam/tophat2/tophat2/2.1.0) (Kim et al. 2013), la cual genera alineamientos en formato *Binary Alignment Map* (BAM). Los archivos del

transcriptoma para cada muestra constan de dos archivos de lecturas, una forward y otra reverse, esto se consideró al momento de introducir los parámetros y los archivos de entrada. Se emplearon los archivos de genoma de referencia y de anotaciones descritos previamente (6.2.3.4.1). Los parámetros de entrada empleados se muestran en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Parámetros empleados en TopHat2.

<b>Parámetro de entrada</b>	<b>Valor</b>
Is this single-end or paired-end data?	paired
RNA-Seq FASTQ file, forward reads	<b>(Archivo FASTQ, lecturas <i>forward</i>)</b>
RNA-Seq FASTQ file, reverse reads	<b>(Archivo FASTQ, lecturas <i>reverse</i>)</b>
Mean Inner Distance between Mate Pairs	300
Std. Dev for Distance between Mate Pairs	20
Report discordant pair alignments?	Yes
Use a built-in reference genome or own from your history	history
Select the reference genome	<b>(Archivo del genoma de referencia)</b>
TopHat settings to use	full
Max realign edit distance	1000
Max edit distance	2
Library Type	FR Unstranded
Final read mismatches	2
Use bowtie -n mode	No
Anchor length (at least 3)	8
Maximum number of mismatches that can appear in the anchor region of spliced alignment	0
The minimum intron length	70
The maximum intron length	500000
Allow indel search	Yes
Max insertion length.	3
Max deletion length.	3
Maximum number of alignments to be allowed	20
Minimum intron length that may be found during split-segment (default) search	50
Maximum intron length that may be found during split-segment (default) search	500000
Number of mismatches allowed in each segment alignment for reads mapped independently	2
Minimum length of read segments	25
Output unmapped reads	True
Do you want to supply your own junction data	Yes
Use Gene Annotation Model	Yes
Gene Model Annotations	<b>(Archivo de anotaciones)</b>
Use Raw Junctions	No
Only look for supplied junctions	No
Use coverage-based search for junctions	auto
Use Microexon Search	No
Do Fusion Search	No
Set Bowtie2 settings	No
Specify read group?	no
Job Resource Parameters	no

### 6.2.3.4.5. Ensamblaje de los transcritos mediante Cufflinks

Las lecturas mapeadas se ensamblaron con Cufflinks v2.2.1 (Galaxy Tool ID: toolshed.g2.bx.psu.edu/repos/devteam/cufflinks/cufflinks/2.2.1.0) (Trapnell et al. 2010) utilizando como archivos de entrada los archivos de alineamiento BAM generados con TopHat2 para generar un conjunto de transcritos por muestra. Los parámetros de entrada usados se muestran en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Parámetros empleados en Cufflinks.

Parámetro de entrada	Valor
SAM or BAM file of aligned RNA-Seq reads	(Archivo de alineamiento BAM)
Max Intron Length	300000
Min Isoform Fraction	0.1
Pre MRNA Fraction	0.15
Use Reference Annotation	Use reference annotation
Reference Annotation	(Archivo de anotaciones)
Count hits compatible with reference RNAs only	No
Perform Bias Correction	Yes
Reference sequence data	history

### 6.2.3.4.6. Cuantificación de los transcritos mediante Cuffcompare

Las comparaciones se realizaron con el programa Cuffcompare (Trapnell et al. 2012) donde se utilizaron como archivos de entrada los archivos .gtf generados por Cufflinks a partir de cada archivo en formato BAM usado como entrada. Los parámetros de entrada utilizados se indican en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.** Parámetros empleados en Cuffcompare.

Parámetro de entrada	Valor
GTF file(s) produced by Cufflinks	(Archivos .gtf producidos por Cufflinks)*
Use Reference Annotation	Yes
Reference Annotation	(Archivo de anotaciones)
Ignore reference transcripts that are not overlapped by any input transfrags	False
Ignore input transcripts that are not overlapped by any reference transcripts	False
Use Sequence Data	Yes
Choose the source for the reference list	history
Using reference file	(Archivo del genoma de referencia)
discard (ignore) single-exon transcripts	No
Max. Distance for assessing exon accuracy	100
Max.Distance for transcript grouping	100
discard intron-redundant transfrags sharing 5'	False

\*Se generaron 5 archivos, uno por transcriptoma.

### 6.2.3.4.7. Análisis de expresión diferencial mediante Cuffdiff

Finalmente, se realizó el análisis de expresión diferencial con el programa Cuffdiff v2.2.1 (Trapnell et al. 2013) para obtener los genes sobre y sub-expresados en GLC-LAC412 respecto a GLC-pPIC9 (comparación CEPAS), en LAC-LAC412 respecto a GLC-LAC412 (comparación SUSTRATO) y en LACMET-LAC412 respecto a LAC-LAC412 (comparación METANOL). Como archivos de entrada se utilizaron los archivos generados por Cuffcompare, los archivos BAM generados por TopHat2 (6.2.3.4.4), y el genoma y archivo de anotaciones .gtf de *P. pastoris* modificados (6.2.3.4.1). Se emplearon los parámetros mostrados en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Parámetros empleados en Cuffdiff.

Parámetro de entrada	Valor
Transcripts	(Archivo de transcritos combinados de Cuffcompare)
Omit Tabular Datasets	False
Generate SQLite	True
Input data type	BAM
Name	pPIC9
Replicates	(Archivo BAM de la condición GLC-pPIC9)
Name	GLU412
Replicates	(Archivo BAM de la condición GLC-LAC412)
Name	LAC412
Replicates	(Archivos BAM [2] de la condición LAC-LAC412)
Name	LACMET412
Replicates	(Archivo BAM de la condición LACMET-LAC412)
Library normalization method	quartile
Dispersion estimation method	pooled
False Discovery Rate	0.05
Min Alignment Count	10
Use multi-read correct	True
Perform Bias Correction	Yes
Reference sequence data	history
Using reference file	(Archivo del genoma de referencia)
Include Read Group Datasets	No
Include Count Based output files	No
apply length correction	cufflinks effective length correction
Set Additional Parameters for single end reads? (not recommended for paired-end reads)	No
Set Advanced Cuffdiff parameters?	No
Job Resource Parameters	no

Los niveles de expresión de cada gen mapeado en el genoma de referencia fueron determinados por el programa a partir del número de lecturas mapeadas por kilobase de regiones de exones por millón de lecturas mapeadas en el genoma de referencia (FPKM), el cual es proporcional al nivel de expresión e independiente de la cantidad de RNA.

#### **6.2.3.4.8. Análisis estadístico de la expresión diferencial de genes**

El programa Cuffdiff integra un modelo de prueba estadística para decidir si la expresión diferencial es significativa. Su algoritmo combina estimados de incertidumbre y variabilidad de los replicados empleando un modelo beta binomial negativo de la variabilidad del conteo de fragmentos para estimar la varianza de las cuentas para cada transcrito en cada biblioteca. Las varianzas estimadas se emplean en el análisis estadístico para reportar genes y transcritos con expresión diferencial significativa (Trapnell et al. 2013). Se consideró que un gen en particular estaba expresado diferencialmente si el valor  $p$  corregido considerando el *false discovery rate* (valor  $q$ ) reportado por Cuffdiff para un gen en una comparación era menor o igual a 0.05 ( $q \leq 0.05$ ). Además, se analizó un subconjunto de los genes estadísticamente significativos con expresión diferencial de más del doble, eligiendo los que tuvieran un logaritmo en base 2 de la proporción de los niveles de expresión de un gen en las dos muestras a comparar ( $\log_2[\textit{fold change}]$ ) mayor a 1 (sobre-expresión) o menor a -1 (sub-expresión).

#### **6.2.3.5. Análisis de ontología de genes de los genes expresados diferencialmente en las tres comparaciones**

Para identificar los términos de ontología de genes sobrerrepresentados entre los genes sobre o sub-expresados en las comparaciones evaluadas, se realizó un análisis de ontología de genes. Éste se llevó a cabo con los programas Cytoscape 3.4.0 (Shannon et al. 2003) y ClueGO 2.1.6 (Bindea et al. 2009), usando las bases de datos de ontología de genes GO\_CellularComponent-Custom\_28.01.2018\_00h00, GO\_BiologicalProcess-Custom\_28.01.2018\_00h00 y GO\_MolecularFunction-Custom\_28.01.2018\_00h00 de *P. pastoris* vinculadas al programa.

Se introdujeron por separado las listas de genes sobre y sub-expresados de las tres comparaciones de los transcriptomas, y se llevó a cabo el análisis con los parámetros por defecto, excepto que se activó el parámetro *Use GO Term Fusion*. Se mantuvo la opción estándar *GO Term Pathway Selection* en 4 % (sólo se reportarían los términos GO con el 4 % de sus genes anotados sobre o sub-expresados). Se seleccionaron como términos GO sobrerrepresentados aquellos con un valor  $p$  corregido menor o igual a 0.05, y se registraron en una tabla.



Para resumir los resultados de los términos GO sobrerrepresentados entre las listas de genes, eliminando los términos redundantes, se empleó la herramienta REViGO (<http://revigo.irb.hr/>) (Supek et al. 2011). Se usaron como datos de entrada los identificadores de los términos GO sobrerrepresentados de cada una de las listas de genes sobre o sub-expresados de las tras comparaciones, así como sus valores p corregidos. Se cambió el parámetro *Allowed similarity* a 0.5 antes de hacer la reducción de la lista de términos GO. Los términos GO de la lista reducida resultante se registraron en una tabla.

#### **6.2.3.6. Análisis de expresión diferencial de los genes implicados en el metabolismo central**

En los archivos generados por el programa Cuffdiff, se localizaron aquellos genes implicados directamente en rutas metabólicas relacionadas con el metabolismo central (glicólisis, ciclo de Krebs y vía de las pentosas-fosfato) con el objetivo de determinar el impacto de la lactosa y la presencia de los genes heterólogos en el metabolismo de la levadura. Los identificadores de los genes de estas tres rutas metabólicas fueron obtenidos de la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa et al. 2016). Además, se llevó a cabo un análisis similar al de ontología de genes (6.2.3.5) con los programas Cytoscape 3.4.0 y ClueGO 2.1.6, usando la base de datos KEGG\_28.01.2018 de *P. pastoris* y empleando los parámetros por defecto, modificando solamente la opción *GO Term Pathway Selection* a All. Los resultados obtenidos se utilizaron para corroborar el número de genes de cada ruta metabólica expresados diferencialmente en las comparaciones analizadas.

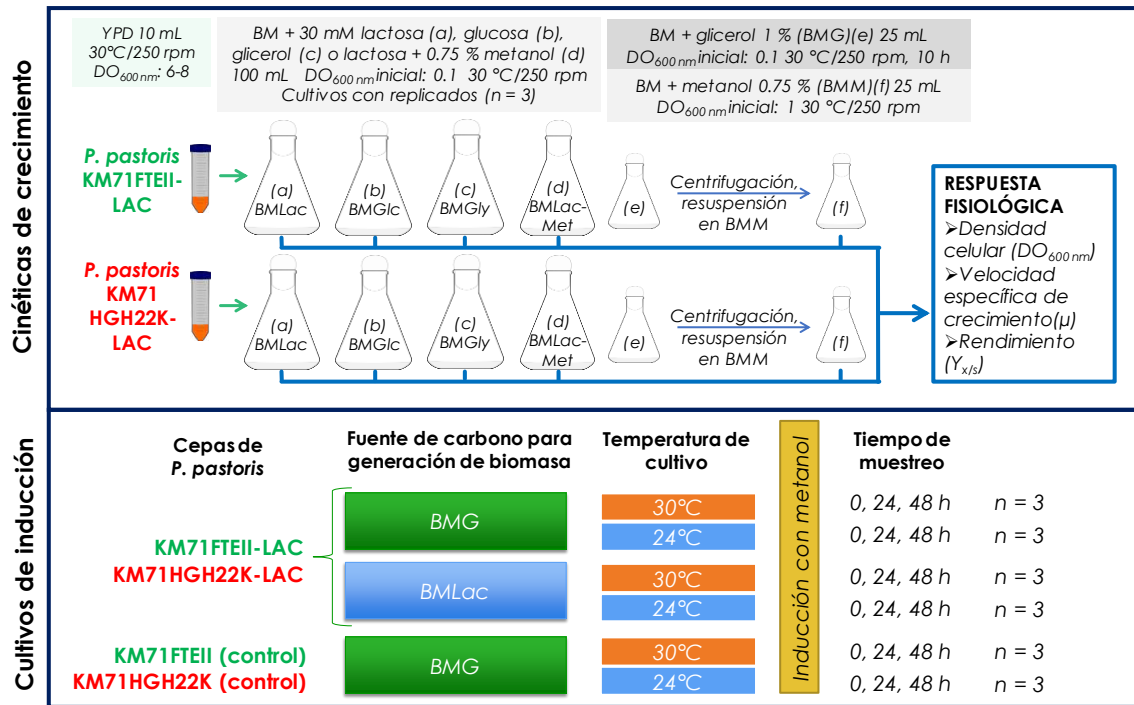
#### **6.2.3.7. Análisis de expresión diferencial de los genes implicados en el transporte de carbohidratos y en la vía de utilización del metanol**

En los archivos generados por el programa Cuffdiff, se localizaron los genes de transportadores de carbohidratos y de la vía de utilización del metanol. Los identificadores de los genes se obtuvieron de publicaciones en donde se describen por primera vez los genes de los transportadores de carbohidratos de *P. pastoris* (Mattanovich et al. 2009), en donde se amplía la lista de los mismos (Prielhofer et al. 2015) y en donde se mencionan los genes de la vía de utilización del metanol (Küberl et al. 2011). Los datos de expresión diferencial se utilizaron para elaborar gráficas con el  $\log_2(\text{fold change})$ .

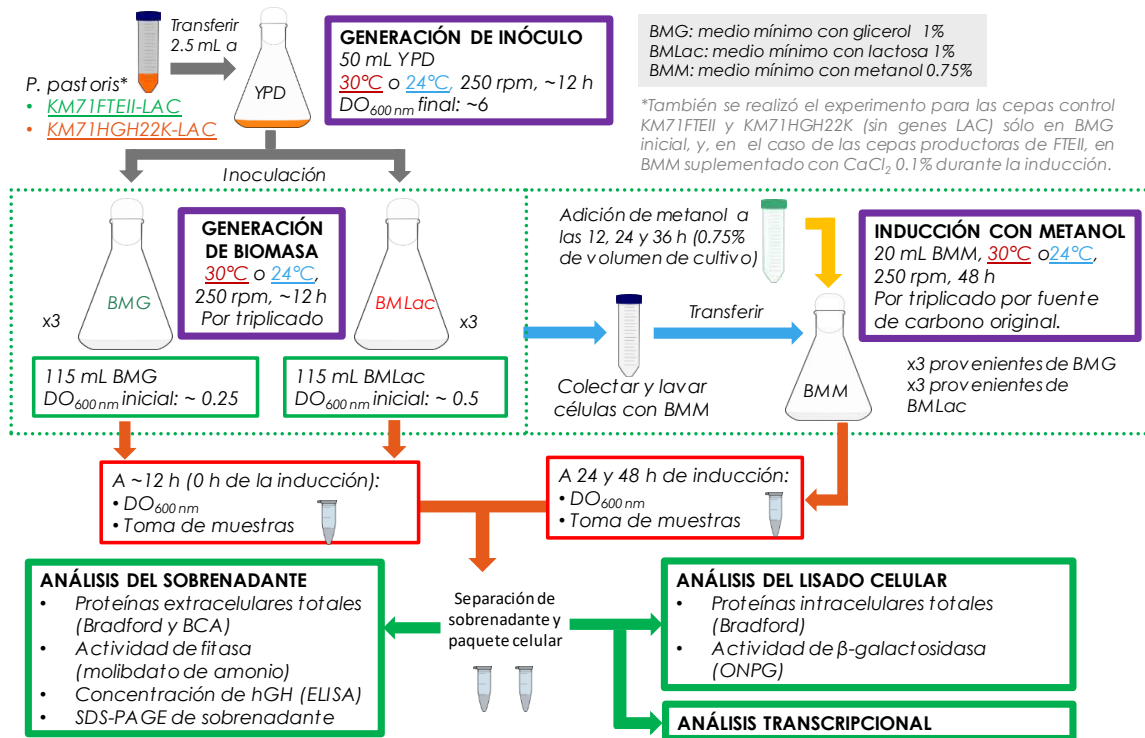
### **6.3. OBJETIVO 2. Evaluación del comportamiento metabólico de las cepas KM71FTEII-LAC, KM71HGH22K-LAC y sus respectivas cepas control cultivadas en lactosa, glucosa, glicerol y lactosa con metanol; y el efecto de la lactosa y el glicerol sobre la expresión de genes regulados por los promotores *AOXI* y *GAP* y dos genes del metabolismo de metanol mediante RT-qPCR.**

#### **6.3.1. Estrategia general**

Se evaluó el efecto de la fuente de carbono y la temperatura sobre el nivel de expresión de los genes heterólogos regulado por los promotores *AOXI* y *GAP* utilizando las cepas de *P. pastoris* KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC y sus respectivas cepas control: KM71FTEII y KM71HGH22K. El efecto de la fuente de carbono se evaluó preliminarmente realizando cinéticas de crecimiento de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en medios con lactosa, glucosa, glicerol, lactosa con metanol y medio mínimo con metanol (BMLac, BMGlc, BMGly, BMLacMet y BMM respectivamente, descritos en el **Anexo 2**) para determinar densidad celular,  $\mu$ , y  $Y_{x/s}$ . Posteriormente, se realizaron cultivos para determinar el efecto de la fuente de carbono en la expresión de genes regulados por el promotor *AOXI*, los cuales constaron de dos fases: con una etapa de generación de biomasa y otra de inducción del promotor *AOXI*. En la etapa de generación de biomasa, las cepas se cultivaron en medio suplementado con glicerol (BMG) o lactosa (BMLac) 1 %. Posteriormente, la biomasa celular generada se transfirió a medio de inducción con metanol (BMM o BMM-CaCl<sub>2</sub>, este último para las cepas productoras de FTEII) y se cultivaron a dos temperaturas: 24 o 30 °C. Se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 h de la inducción con metanol, y se evaluaron los rendimientos de producción de proteínas heterólogas por unidad de biomasa y la expresión diferencial de distintos genes, como se describirá en apartados posteriores. El diseño experimental de la estrategia general descrita se muestra en la **Figura 8**. La estrategia general de los cultivos para la producción de proteína recombinante mediante inducción con metanol se esquematiza en la **Figura 9**. Los procedimientos de las etapas del cultivo y de los análisis de las muestras se describen en apartados posteriores.



**Figura 8.** Diseño experimental del segundo objetivo particular. Se incluye el diseño experimental para las cinéticas de crecimiento y para la evaluación del efecto de la fuente de carbono en la expresión de genes regulados por el promotor *AOX1* (cultivos de inducción).



**Figura 9.** Estrategia experimental del segundo objetivo particular: diagrama de flujo de los cultivos para la inducción de genes heterólogos regulados por el promotor *AOX1*.

### **6.3.2. Evaluación de parámetros fisiológicos de las cepas de *P. pastoris* KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC cultivadas en medios con lactosa, glucosa, glicerol, lactosa con metanol y metanol**

Para la evaluación de parámetros fisiológicos de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC, se realizaron cinéticas de crecimiento en los medios BMLac, BMGlc, BMGly y BMLacMet (todos los medios de cultivo se describen en el **Anexo 1**) de la forma que se indicó previamente para las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9 en los apartados **6.2.2.1**, **6.2.2.2**, **6.2.2.3**, **6.2.2.4** y **6.2.2.5**. Además, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio BMM, con un protocolo modificado en el cual se inocularon 25 mL de medio BMG, contenido en un matraz estéril de 250 mL, a una  $DO_{600\text{ nm}}$  inicial de 0.1 y se incubaron por aproximadamente 10 h a 30 °C y 250 rpm, tras lo cual se determinó su  $DO_{600\text{ nm}}$ . Con este dato se calculó el volumen de cultivo necesario para inocular 25 mL de medio BMM a una  $DO_{600\text{ nm}}$  inicial de 1. Se transfirió el volumen de cultivo calculado a tubos estériles de 50 mL, los cuales se centrifugaron por 20 min a 4000 rpm y 4 °C. Se decantó el medio de cultivo y las células se resuspendieron en 10 mL de BMM para lavarlas, tras lo cual se volvieron a centrifugar por 20 min a 4000 rpm y 4 °C, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 25 mL de medio BMM, contenido en un matraz estéril de 250 mL. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 250 rpm. Se realizaron los mismos procedimientos de toma y análisis de muestras descritos previamente en este apartado.

### **6.3.3. Cultivos de inducción de genes regulados por el promotor *AOXI***

#### **6.3.3.1. Cultivos iniciales en BMG o BMLac**

Se inocularon 50 mL de YPD contenidos en un matraz de 500 mL con 2.5 mL de un cultivo reactivado de la cepa de *P. pastoris* KM71FTEII-LAC o KM71HGH22K-LAC (o sus cepas control sin los genes *LAC*: KM71FTEII o KM71HGH22K). El cultivo se incubó a 30 °C o 24 °C, según el experimento, por aproximadamente 12 h hasta alcanzar una  $DO_{600\text{ nm}}$  aproximada de 6. Este cultivo se empleó para la inoculación de 115 mL de medio BMG o BMLac, considerando una  $DO_{600\text{ nm}}$  inicial de 0.25 para BMG y 0.5 para BMLac. Los cultivos en BMG o BMLac se realizaron en matraces de 1 L y por triplicado, incubando a 30 °C o 24 °C según el experimento, y 250 rpm.

### **6.3.3.2. Cultivo de inducción en BMM y BMM-CaCl<sub>2</sub>.**

Después de aproximadamente 12 h de cultivo, se midió la DO<sub>600 nm</sub> de los cultivos en BMG y BMLac (6.3.3.1), tras lo cual se transfirieron a tubos de 50 mL esterilizados. El volumen transferido fue de 70 mL para BMG y 100 mL para BMLac, aproximadamente. Los tubos con cultivo se centrifugaron por 20 min a 4000 rpm y 4 °C, centrifugando el volumen total de cultivo en el mismo tubo mediante centrifugaciones sucesivas. Los tubos centrifugados se decantaron en condiciones de esterilidad y se les adicionó BMM (aproximadamente 2 volúmenes de la pastilla) para resuspender y lavar las células, y se centrifugaron por 20 min a 4000 rpm y 4 °C. Se descartó el BMM empleado para el lavado y el paquete celular se resuspendió en 20 mL de BMM. En el caso de los cultivos de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII, el BMM se sustituyó por BMM-CaCl<sub>2</sub>, debido a que el Ca<sup>2+</sup> mejora la estabilidad de FTEII. Cada cultivo resuspendido se transfirió a un matraz de 250 mL y se incubó a 30 °C o 24 °C, según el experimento, y 250 rpm. Se añadió metanol a una concentración final de 0.75 % a los cultivos cada 12 h (a las 12, 24 y 36 h de inducción), considerando el volumen de las muestras extraídas. Se determinó la DO<sub>600 nm</sub> de los cultivos a las 0, 24 y 48 h de inducción.

### **6.3.3.3. Toma de muestras**

Para la toma de muestras al tiempo 0 h de inducción, de cada matraz en BMG o BMLac (6.3.3.1) se obtuvieron los paquetes celulares a partir de 2 mL de cultivo para las muestras que se emplearían en la obtención de lisados celulares, y de 6 a 10 mL de cultivo para las conservas en RNAlater™ (Ambion, ThermoFisher, Cat. AM7024) que se destinarían a la preparación de RNA, mediante centrifugaciones sucesivas en tubos de 1.5 o 2 mL por 10 min a 6000 g y 4 °C. Los paquetes celulares destinados a lisados celulares y los sobrenadantes se separaron del paquete celular al transferirlos a tubos de 1.5 o 2 mL y se almacenaron a -20 °C. A los paquetes celulares para las conservas en RNAlater™ se les añadieron de 500 µL a 1 mL del reactivo para resuspender por completo las células, que posteriormente se incubaron por 24 h a 4 °C. Tras la incubación, los tubos se centrifugaron por 10 min a 6000 rpm y 4 °C, se descartó el sobrenadante y se almacenó la pastilla a -20 °C.

Para las muestras de las 24 y 48 h de inducción (6.3.3.2), se siguió el mismo procedimiento que para la toma de muestras de tiempo 0 h, sin embargo, el volumen de cultivo para cada muestra fue de 1 mL, tanto para lisados como para RNA.

#### 6.3.3.4. Preparación de lisados celulares

Se empleó el procedimiento descrito en el manual del kit de expresión de *Pichia* (Invitrogen 2014), que se resume a continuación. Los paquetes celulares, previamente descongelados, se lavaron resuspendiendo las células en 100 µL de buffer de lisis y centrifugando por 10 min a 3000 g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron a una DO<sub>600 nm</sub> final de 50 a 100 en buffer de lisis, calculada según la DO<sub>600 nm</sub> y el volumen del que se obtuvo el paquete celular. Se añadió al tubo un volumen igual de perlas de vidrio previamente lavadas con HCl. La muestra se procesó en vórtex por 30 s y luego se incubó en hielo por 30 s, y se repitió este ciclo de procesamiento de incubación 8 veces en total. Se centrifugó la muestra por 10 min a 12000 g y 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se almacenó a -20 °C.

##### 6.3.3.4.1. Cálculo de rendimiento de proteína intracelular por unidad de biomasa

Los rendimientos de proteína intracelular producida por unidad de biomasa ( $Y_{PI/x}$ , mg/g) se calcularon empleando la **Ecuación 2**, donde  $[PI]_L$  es la concentración de proteína (mg/L) en el lisado celular,  $V_L$  el volumen (µL) de resuspensión del paquete celular para el lisado,  $DC_M$  es la densidad celular (g/L) del cultivo de origen de la muestra procesada y  $V_M$  es el volumen (µL) de muestra procesada para la obtención del paquete celular.

$$Y_{PI/x} = \frac{([PI]_L)(V_L)}{(DC_M)(V_M)}$$

**Ecuación 2.** Cálculo del rendimiento de proteína intracelular por unidad de biomasa.

##### 6.3.3.5. Ensayo para actividad de β-galactosidasa

Para este ensayo, se empleó el procedimiento descrito en el manual del kit de expresión de *Pichia* (Invitrogen 2014). En un tubo de 2 mL, se agregó 1 mL de buffer Z a temperatura ambiente y 10 µL de muestra, consistente en una dilución 1:100 de los lisados celulares en buffer de lisis. Se incubó la mezcla por 3 min a 28 °C en un bloque térmico (Thermomixer R, Eppendorf), a la que se agregaron 200 µL de ONPG 4 mg/mL y se

incubó la reacción por 10 min a 28 °C. Se añadieron 500 µL de carbonato de sodio 1 M a cada tubo para detener la reacción. Las reacciones se transfirieron a celdas semi-micro para espectrofotómetro (Brand) y se cuantificó su absorbancia a 420 nm. Para cuantificar la velocidad inicial de la reacción, ésta debía comenzar a desarrollar color amarillo al momento de detenerla. Si no lo desarrollaba o si lo desarrollaba rápidamente, se repetía el ensayo con una menor o mayor dilución del lisado, respectivamente.

La actividad de β-galactosidasa se calculó con la **Ecuación 3**, mencionada en el mismo protocolo, en donde U equivale a unidad de β-galactosidasa, definida como la conversión de 1 nmol de ONPG/min a 28 °C; DO<sub>420 nm</sub> es la absorbancia a 420 nm de las reacciones y t es el tiempo de reacción, que generalmente es de 10 min.

$$U \text{ de } \beta - \text{galactosidasa} / \text{mg de proteína total} = \frac{(\text{DO}_{420 \text{ nm}})(380)}{(t)(\text{mg de proteína en la reacción})}$$

**Ecuación 3.** Cálculo de actividad de β-galactosidasa.

Se debe mencionar que en el manual del kit de expresión de *Pichia* no se define la equivalencia de las unidades de β-galactosidasa ni se menciona el origen de la constante 380 de la **Ecuación 3**. El protocolo en el cual se basa este ensayo (Miller 1972), así como otro protocolo derivado (Norton y Coffin 1985), menciona que la constante 380 se usa para convertir la DO<sub>420 nm</sub> a unidades, definidas como la catálisis de 1 nmol de ONPG/min, y depende del coeficiente de extinción molar del *o*-nitrofenol (4500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

#### **6.3.3.6. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford**

Para la determinación de la concentración de proteínas totales, intra o extracelulares, se empleó el método de Bradford (Bradford 1976), cuyo principio consiste en que la unión de moléculas de proteína al colorante de Coomassie en condiciones ácidas resulta en un cambio de la coloración del azul brillante de Coomassie de café a azul. El método depende de la presencia de residuos básicos (arginina, lisina e histidina) en las proteínas, los cuales contribuyen a la formación del complejo proteína-colorante. Para realizar la recta de calibración del ensayo, se prepararon estándares de concentración por triplicado a partir de una solución de ASB 50 µg/mL en tubos de 2 mL, las cuales variaban en concentración de 0 a 45 µg/mL. La concentración de los estándares y los volúmenes para su preparación se muestran en la **Tabla 13**. La composición de los reactivos se describe en el **Anexo 1**.

**Tabla 13.** Concentración y preparación de los estándares de ASB para la recta de calibración de determinación de proteínas por el método de Bradford.

Estándar	Concentración (µg/mL)	ASB (50 µg/mL) (µL)	Agua destilada (µL)	Azul de Coomassie (µL)
1	0.0	0	200	800
2	5.0	20	180	800
3	7.5	30	170	800
4	15.0	60	140	800
5	22.5	90	110	800
6	30.0	120	80	800
7	45.0	180	20	800

Una vez preparados los estándares de ASB, se les agregaron 800 µL de reactivo de Bradford, se incubaron 5 min a temperatura ambiente, se transfirieron celdas semi-micro para espectrofotómetro y se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm. Los valores se registraron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel y a partir de los datos obtenidos, se realizó una recta de calibración graficando los datos. Se calculó la línea de tendencia del gráfico junto con su ecuación y su valor de  $r^2$ , y con los datos de la ecuación de la línea de tendencia se realizó la interpolación de los valores obtenidos de las muestras. La recta de calibración se realizó cada vez que se cambió de reactivo de Bradford o si había pasado más de una semana desde la última vez que se usó el reactivo.

Para la preparación de las muestras a analizar, se realizaron diluciones de las muestras de tal forma que la concentración de la dilución no sobrepasara los 45 µg/mL, (valor máximo de la recta de calibración). Esta dilución varió según si la muestra provenía de lisados celulares o de sobrenadante de cultivo, y también del tiempo de inducción. Para las muestras de lisados celulares, primero se realizó una dilución 1:100 de la misma con buffer de lisis (del ensayo de actividad de β-galactosidasa) y luego una dilución 1:2 o 1:4 de ésta con agua destilada para la determinación de proteínas. Para las muestras de sobrenadantes, las diluciones podían variar desde el sobrenadante sin dilución, hasta diluciones 1:20 con agua destilada. Una vez realizada la dilución, se colocaron 200 µL de ésta en un tubo de 2 mL (por triplicado para cada muestra) y se les agregaron 800 µL de reactivo de Bradford. Se incubaron 5 min a temperatura ambiente, se transfirieron a celdas semi-micro para espectrofotómetro y se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm.



Para calcular la concentración de proteínas en las muestras, se empleó la recta de calibración realizada previamente, se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos de las muestras y se multiplicaron por el factor de dilución para obtener la concentración real de la muestra en  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **6.3.3.7. Determinación de la concentración de proteínas por el método de BCA**

La determinación de la concentración de proteínas en los sobrenadantes de inducción también se llevó a cabo por el método del ácido bicinonínico (BCA) (Smith et al. 1985). El principio de este ensayo consiste en que las proteínas pueden reducir el  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  en solución alcalina, resultando en la formación de color morado debido al complejo resultante cuando el ion  $\text{Cu}^{+1}$  quela dos moléculas de BCA. La reducción del cobre es ocasionada principalmente por los residuos de aminoácidos cistina o cisteína, tirosina y triptófano. Sin embargo, a diferencia de los métodos basados en la unión del azul de Coomassie (Bradford), la cadena peptídica universal también contribuye a la formación de color, ayudando a minimizar la variabilidad causada por las diferencias en la composición de las proteínas, ya que en el ensayo de Bradford la formación de complejo azul depende de la presencia de residuos básicos en las proteínas.

La determinación de proteínas por el método de BCA, se realizó mediante el kit QuantiPro™ (Sigma-Aldrich). Para las reacciones del ensayo se requirieron 150  $\mu\text{L}$  de muestra o estándares. Se emplearon estándares de 0, 15, 30 y 45  $\mu\text{g/mL}$  de ASB para la recta de calibración, preparados a partir de una solución stock de ASB 50  $\mu\text{g/mL}$  y diluyendo con el buffer QuantiPro™ Buffer QA pH 11.25 incluido en el kit según se indica en la sección de calibración 1 de la **Tabla 14**. La solución de ASB 50  $\mu\text{g/mL}$  se preparó a partir de la solución de ASB 1  $\text{mg/mL}$  incluida en el kit, mezclando 0.25 mL de ASB 1  $\text{mg/mL}$  con 4.75 mL de buffer QuantiPro™ Buffer QA pH 11.25 del kit.

**Tabla 14.** Concentración de los estándares de ASB para la recta de calibración de determinación de proteínas por el método de BCA.

CALIBRACIÓN 1			
Estándar	Concentración (µg/mL)	ASB (50 µg/mL) (µL)	QuantiPro™ Buffer QA pH 11.25 (µL)
1	0	0	150
2	15	45	105
3	30	90	60
4	45	135	15
CALIBRACIÓN 2			
Estándar	Concentración (µg/mL)	ASB (1 mg/mL) (µL)	QuantiPro™ Buffer QA pH 11.25 (µL)
1	0	0	150
2	150	22.5	127.5
3	250	37.5	112.5
4	300	45	105
5	400	60	90

Las muestras de los sobrenadantes analizados se prepararon diluyendo el sobrenadante con el buffer QuantiPro™ Buffer QA pH 11.25. Se diluyeron hasta 8 veces, en el caso de los sobrenadante de las cepas productoras de hGH, y hasta 400 veces para los sobrenadantes de la cepa KM71FTEII-LAC, por lo cual en las determinaciones de los cultivos de la cepa control KM71FTEII y de los cultivos con CaCl<sub>2</sub> de las cepas productoras de FTEII se optó por hacer una nueva recta de calibración preparando los estándares como se indica en la sección de calibración 2 de la **Tabla 14**.

Se calculó la cantidad necesaria de colorante a preparar según el número de estándares y las muestras, considerando que la reacción requiere de 150 µL de colorante por muestra o estándar y empleando la proporción 500 µL de solución QuantiPro™ BCA QB pH 7.5 por cada 500 µL de buffer QuantiPro™ Buffer QA pH 11.25 y añadiendo 20 µL de solución de sulfato de cobre (II).

El ensayo se realizó de la siguiente manera. Se preincubaron los 150 µL de cada muestra o estándar y el colorante por separado en tubos de 2 mL a 60 °C por 5 a 10 min, luego se agregaron 150 µL de colorante a las muestras y estándares y se incubaron las reacciones a 60 °C por 1 h. Transcurrido el tiempo, se transfirieron a celdas ultra-micro para espectrofotómetro y se leyó su absorbancia a 562 nm en el nano-espectrofotómetro, empleando la celda en lugar de la base para colocar muestras. La linealidad de las dos

curvas fue equivalente, de tal manera que las concentraciones estimadas con las dos curvas fueran equivalentes y comparables.

### 6.3.3.8. Determinación de la actividad de fitasa

Para determinar la actividad de fitasa FTEII en los sobrenadantes libres de células, se usó un método de medición de punto final colorimétrico empleado previamente en el grupo de trabajo (Guerrero-Olazarán et al. 2010). Dicho método cuantifica la cantidad de fosfato liberado del fitato en la reacción catalizada por la fitasa empleando ácido ascórbico y molibdato de amonio. El ortofosfato liberado en la reacción enzimática de la fitasa forma un complejo de fosfomolibdato, que se cuantifica a 820 nm y se compara con estándares.

Las muestras de sobrenadante se desalaron para eliminar residuos de fosfato utilizando cromatografía de exclusión molecular de la manera que se describe a continuación. Se lavó previamente una columna PD-10 Sephadex G-25 con 20 mL de buffer de elución (Tris-HCl 100 mM, NaCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM y glicerol 2 %) y se eluyó por gravedad hasta descartar la totalidad de la solución. Se añadieron a la columna 600 µL de la muestra a desalar (previamente filtrada a través de un filtro Millipore de 0.22 µM) y 1.9 mL de buffer de elución (total de muestra y buffer: 2.5 mL), y se eluyó por gravedad hasta que el total de la muestra entró completamente en la resina de la columna. Después se agregaron a la columna 3.5 mL de buffer de elución y se eluyó por gravedad colectando en un tubo de 15 mL toda la fase móvil que eluyó de la columna.

Se prepararon los estándares iniciales de fosfato monobásico de potasio con agua Milli-Q, cuyas concentraciones son 5.18 mM para el estándar A, 2.59 mM para el estándar B y 0.518 mM para el estándar C, este último se preparó realizando una dilución 1:10 del estándar A. La preparación de los estándares para la recta de calibración se muestra en la **Tabla 15**.

**Tabla 15.** Volúmenes para la preparación de los estándares para la recta de calibración.

Cantidad de fósforo (µg)	Volumen requerido de los estándares (µL)	Volumen de agua (µL)
0.0	0	100
0.8	25 (estándar C)	75
1.9	50 (estándar C)	50
3.9	25 (estándar B)	75
7.9	40 (estándar B)	60

Para llevar a cabo la reacción enzimática, se agregaron por triplicado 60  $\mu\text{L}$  de solución de sustrato (Tris-HCl 100 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM y fitato de sodio 1.6 mM) en un tubo de 2 mL, previamente incubada a 37 °C para equilibrar la temperatura, y 40  $\mu\text{L}$  de muestra. De la misma manera se preparó un control negativo con 60  $\mu\text{L}$  de solución de reacción (Tris-HCl 100 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM) y 40  $\mu\text{L}$  de muestra. Adicionalmente, se preparó un blanco de fitato en un tubo de 2 mL, agregando 60  $\mu\text{L}$  de solución de reacción y 40  $\mu\text{L}$  de solución de sustrato. Todos los tubos fueron incubados a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo agregando 100  $\mu\text{L}$  de TCA 15 %. Posteriormente, se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de la solución colorante (ácido ascórbico 10 %, molibdato de amonio 2.5 %, ácido sulfúrico 6 N y agua Milli-Q) recién preparada. Se incubaron los tubos de las muestras y los blancos a 37 °C por 45 min, se transfirieron las reacciones a celdas semi-micro para espectrofotómetro, se midió el valor de absorbancia a 820 nm en el espectrofotómetro y se obtuvo la cantidad de fósforo liberado interpolando el valor de la absorbancia obtenida en la recta de calibración. Los datos se registraron en una plantilla de Excel que permitió el cálculo de la actividad volumétrica enzimática empleando la **Ecuación 4**. El valor obtenido con esta ecuación se multiplicó por la cantidad de veces que se diluyó la muestra de acuerdo con el volumen final obtenido después de desalarse. Se definió una unidad de fitasa como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1  $\mu\text{mol}$  de fosfato en un minuto bajo las condiciones del ensayo (fitato 1.6 mM,  $\text{Ca}^{+2}$  1 mM, 37 °C y pH 7.5).

$$A_{vf} = \left( \frac{(P)25}{(31)t} \right) (FD)$$

**Ecuación 4.** Cálculo de actividad volumétrica de fitasa.

Donde  $A_{vf}$  es la actividad volumétrica de fitasa en U/mL, P es la cantidad de fósforo liberado durante la reacción enzimática (mg), 25 es un factor de conversión (inverso del volumen de muestra usado en la reacción enzimática [mL]), 31 corresponde al peso atómico del fósforo (g/mol), t es el tiempo de incubación de la reacción enzimática (min) y FD es el factor de dilución de la muestra.

#### **6.3.3.9. Cuantificación de la concentración de hGH mediante ELISA indirecto**

La concentración de hGH en los sobrenadantes de los cultivos de inducción se determinó mediante un ELISA indirecto, de la forma que se describe a continuación. Para

preparar la curva estándar del ensayo, se preparó una solución de hGH 50 µg/mL, añadiendo 25 µL de hGH 1 mg/mL (Humatrope, Eli Lilly, en alícuotas almacenadas a -20 °C) a 475 µL de buffer de carbonatos 1X. Luego, se preparó una solución de hGH 3 µg/mL, añadiendo 120 µL de hGH 50 µg/mL a 880 µL de buffer de carbonatos 1X. A partir de la solución realizada en el paso anterior, se hicieron diluciones seriadas 1:2 (250 µL de la dilución anterior en 250 µL de buffer de carbonatos 1X), hasta llegar a una concentración de 23.44 ng/mL (8 diluciones en total contando la de 3 µg/mL). Se depositaron 100 µL de las diluciones de 23.44 hasta 750 ng/mL de hGH por duplicado en una placa Nunc-Immuno (Sigma-Aldrich, Cat. M9419) a partir de la fila B, de menor a mayor concentración utilizando la misma puntilla. Además, 100 µL de alguno de los estándares sobrantes se cargaron en los pocillos de los controles del ensayo que requieren añadir muestra (la composición y distribución en la placa de los controles de ensayo se indica en la **Tabla 16**). A los controles del ensayo se les añadieron solamente los reactivos que se indican en la tabla con “Sí” en la etapa correspondiente del ensayo.

**Tabla 16.** Controles del ensayo de ELISA.

Ubicación de los controles (número de pocillo en fila A)	Muestra*	TBS-T 0.05 % + BSA 1 %	Dilución de anticuerpo primario	Dilución de anticuerpo secundario	Reactivo cromogénico pNPP
1 y 2	No	No	No	No	No
3 y 4	No	Sí	Sí	Sí	Sí
5 y 6	Sí	No	Sí	Sí	Sí
7 y 8	Sí	Sí	No	Sí	Sí
11 y 12	No	No	No	No	Sí

\*Uno de los estándares de la curva de calibración

Para preparar las muestras a analizar, que consistieron en muestras de cultivos de inducción a nivel matraz, se hicieron diluciones con buffer de carbonatos 1X de acuerdo con el tiempo de inducción del cual provenía la muestra. Para la muestra del tiempo 0 h, se hizo una dilución 1:2 (150 µL de muestra y 150 µL de buffer). Para las muestras de 24 h, se hicieron diluciones 1:5 (50 µL de muestra y 200 µL de buffer), 1:50 (50 µL dilución 1:5 y 450 µL de buffer) y 1:100 (150 µL dilución 1:50 y 150 µL buffer). Para las muestras de 48 h, se hicieron diluciones 1:10 (50 µL de muestra y 450 µL de buffer), 1:100 (50 µL dilución 1:5 y 450 µL de buffer) y 1:200 (150 µL dilución 1:50 y 150 µL buffer). En el ELISA se usaron las diluciones 1:2 de 0 h, 1:100 de 24 h y 1:200 de 48 h.

Una vez preparadas las diluciones de las muestras a analizar, se depositaron 100  $\mu$ L de las mismas en la placa y se tapó con película plástica. Se incubó la placa tapizada a 37 °C por 2 h. Posteriormente se vació la placa y se hicieron 3 lavados de la placa depositando TBS-Tween 20 al 0.05 % (TBS-T 0.05 %) cubriendo la totalidad de los pocillos, en el segundo de los cuales se mantuvo el TBS-T 0.05 % en el pocillo por 5 min; y posteriormente se sacudió la placa sobre papel secante para retirar el exceso de líquido, este procedimiento de lavado será referido cuando se mencione el lavado de placa.

Se pesaron 0.4 g de BSA y se disolvieron en 40 mL de TBS-T 0.05 % para preparar TBS-T 0.05 % + BSA 1 %, y se refrigeró esta solución cuando no estaba en uso. Se agregaron a los pocillos 110  $\mu$ L de TBS-T 0.05 % + 1 % BSA, excepto a los controles en los que se indicó no agregarlo, y se incubó la placa por 2 h a 37 °C. Se preparó una dilución 1:5000 del anticuerpo primario (Anti-HGH22 producido en conejo, Affinity Purified Antibody, GenScript, concentración: 1.152 mg/mL) disolviendo 2  $\mu$ L de anticuerpo primario en 10 mL de TBS-T 0.05 % + BSA 1 %. Se vació y lavó la placa 3 veces como se describió anteriormente, se agregaron 100  $\mu$ L de la dilución de anticuerpo primario a los pocillos, excepto a los controles en los que se indicó no agregarlo, y se incubó la placa por 90 min a 37 °C. Se preparó una dilución 1:1000 de anticuerpo secundario (Anti-IgG de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina, Sigma, Cat. A3812) disolviendo 10  $\mu$ L de anticuerpo secundario en 10 mL de TBS-T 0.05 % + BSA 1 %. Se vació y lavó la placa 3 veces como se indicó anteriormente, se agregaron 100  $\mu$ L de la dilución de anticuerpo secundario, y se incubó la placa por 90 min a 37 °C. Se preparó el reactivo cromogénico pNPP. Se vació y lavó la placa 3 veces como se describió anteriormente, se agregaron 100  $\mu$ L de reactivo cromogénico pNPP a los pocillos, y se incubó la placa por 90 min a 37 °C. Transcurrida la incubación, se leyó la absorbancia de la placa a una longitud de onda de 405 nm con lector de microplacas (Bio-Rad) y se obtuvo el registro de las lecturas.

Las absorbancias obtenidas se registraron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel. Se graficaron las absorbancias y la concentración de los estándares. Se obtuvo la línea de tendencia de los estándares mediante un ajuste para que fuera logarítmica. Con los datos resultantes del ajuste, se determinó la concentración de hGH en las muestras, interpolando los datos en la curva de calibración y multiplicando por el factor de dilución.

### 6.3.3.10. Análisis de proteínas por SDS-PAGE

La producción de proteína recombinante extracelular en los cultivos de inducción a las 48 h fue analizada mediante SDS-PAGE, empleando un gel de poliacrilamida al 12 % como gel separador. El gel de poliacrilamida se realizó mezclando los volúmenes de reactivos que se muestran en la **Tabla 17**.

**Tabla 17.** Volúmenes para la preparación de los geles de poliacrilamida.

Solución stock	Gel concentrador ( $\mu\text{L}$ )	Gel separador 12 % ( $\mu\text{L}$ )
Agua destilada	1220	2790
Acrilamida/Bisacrilamida 30 %	260	3120
Tris-HCl/SDS pH 6.8	500	-
Tris-HCl/SDS pH 8.8	-	1990
Persulfato de amonio 10 %	10	80
TEMED	2	5
Volumen final	2000	8000

Se concentró el volumen de las muestras de sobrenadante a analizar utilizando las unidades Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (Millipore), 10 veces para las muestras provenientes de KM71FTEII-LAC, o 40-66 veces para las muestras provenientes de KM71HGH22K-LAC. Las muestras de KM71FTEII-LAC se diluyeron 4 veces más después de la concentración. Aproximadamente de 7 a 10  $\mu\text{L}$  de las muestras concentradas se incubaron con 10  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 2X (Sigma-Aldrich, Cat. S3401-1VL) a 95 °C por 5 min, tras los cuales la mezcla total fue aplicada en el gel de poliacrilamida con una jeringa. Una vez colocadas las muestras en el gel, se aplicó una corriente eléctrica de 10 mA y 70 V para la fase concentradora, hasta que el colorante azul penetró en el gel separador (aproximadamente 20-30 min). Se cambió la corriente eléctrica a 15 mA y 150 V y se continuó la electroelución por 1 h. Posteriormente, el gel fue desensamblado y colocado en un recipiente de plástico conteniendo solución fijadora (metanol 50 % v/v, ácido acético 10 % v/v en agua bidestilada) y permaneció en éste durante 1 h. Se retiró el gel de la solución fijadora, se tiñó con solución colorante de Coomassie (azul brillante de Coomassie 0.5 % p/v, metanol 50 % v/v, ácido acético 10 % v/v, en agua bidestilada) durante 30 min, y posteriormente se transfirió a la solución decolorante (metanol 5 % v/v, ácido acético 7 % v/v, en agua bidestilada). El gel permaneció en esta solución toda la noche hasta que se observaron bandas azules de proteínas en un fondo claro del gel. El gel se documentó tomando una fotografía del gel empleando una placa blanca de acrílico transiluminada con una lámpara de luz blanca.

### 6.3.3.11. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los resultados de concentraciones y rendimientos de proteínas extracelulares totales y actividad de fitasa de las cepas productoras de FTEII (KM71FTEII-LAC y KM71FTEII) se realizaron sin considerar los resultados de las 0 h de inducción debido a la nula actividad de FTEII detectada. Debido a que los cultivos de inducción de la cepa KM71FTEII-LAC se realizaron dos veces por condición de cultivo, en donde la segunda empleó BMM-CaCl<sub>2</sub> en lugar de BMM como medio de inducción, los diseños para el análisis se modificaron como se describe en este apartado. Los cultivos de la cepa KM71FTEII siempre se realizaron con el medio BMM-CaCl<sub>2</sub>, porque este medio proporciona estabilidad a la enzima FTEII producida.

En la **Tabla 18** se muestran los diseños experimentales empleados en las comparaciones estadísticas para determinar los efectos de los distintos factores probados. En el diseño experimental 1 (DE1) se incluye la comparación del efecto de la inserción de los genes *LAC* en el genoma de la cepa (comparación entre KM71FTEII-LAC y KM71FTEII) y la temperatura a las 24 y 48 h; en el diseño experimental 2 (DE2), el efecto de la temperatura, la fuente de carbono inicial (FCI) y el CaCl<sub>2</sub> en el medio de inducción a las 24 y 48 h. Se realizó además una comparación entre todas las condiciones de tratamiento (10 en total, mostradas en la **Tabla 19**) a las 24 y 48 h mediante un ANOVA unifactorial (considerando la combinación de tratamientos y cepas como un mismo factor) y prueba de Tukey como prueba *post-hoc* para determinar las diferencias entre las condiciones. Las pruebas estadísticas de los tres diseños experimentales mencionados se realizaron dos veces, una para cada tiempo muestral (24 o 48 h). Se realizó un ANOVA bifactorial para el análisis estadístico del DE1 y un ANOVA trifactorial en el caso del DE2, ambos empleando una herramienta de análisis estadístico en línea (<http://vassarstats.net/>) seleccionando bajo la opción de ANOVA el ANOVA bifactorial para muestras independientes en el DE1 y ANOVA 2x2x2 para muestras independientes en el DE2. La comparación de todas condiciones de cultivo empleó un ANOVA con una herramienta en línea ([http://astatsa.com/OneWay\\_Anova\\_with\\_TukeyHSD/](http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/)), que además incluía la prueba de Tukey para determinar las diferencias entre los grupos, seleccionando la opción de k=10 tratamientos.



**Tabla 18.** Diseños experimentales para la comparación de los datos obtenidos de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII.

<b>Diseño experimental 1</b>	<b>Diseño experimental 2</b>
Comparación del efecto de la inserción de los genes <i>LAC</i> y la temperatura.	Comparación del efecto de temperatura, FCI y BMM-CaCl <sub>2</sub> .
Datos de BMG como FCI e inducción con BMM-CaCl <sub>2</sub> , no se incluyen los datos de BMLac como FCI ni los de inducción con BMM sin CaCl <sub>2</sub> .	Datos de la cepa KM71FTEII-LAC, no se incluyen los datos de KM71FTEII.

	30 °C (T <sub>1</sub> )	24 °C (T <sub>2</sub> )	Inducción con BMM sin CaCl <sub>2</sub> (Ca <sub>1</sub> )		Inducción con BMM-CaCl <sub>2</sub> (Ca <sub>2</sub> )	
			BMG (FCI <sub>1</sub> )	BMLac (FCI <sub>2</sub> )	BMG (FCI <sub>1</sub> )	BMLac (FCI <sub>2</sub> )
KM71FTEII-LAC (C <sub>1</sub> )	n = 3	n = 3				
KM71FTEII (C <sub>2</sub> )	n = 3	n = 3				
30 °C (T <sub>1</sub> )	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3
24 °C (T <sub>2</sub> )	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3

Factores: C: efecto de genes *LAC* (cepa), T: temperatura, Ca: medio de inducción con CaCl<sub>2</sub>, FCI: fuente de carbono inicial.

Cada tiempo de inducción se evaluó por separado con ambos diseños.

**Tabla 19.** Condiciones de cultivo de las cepas productoras de FTEII.

Cepa	KM71FTEII-LAC								KM71FTEII	
¿CaCl <sub>2</sub> añadido?	No				Sí				Sí	
Medio de cultivo de generación de biomasa	BMG		BMLac		BMG		BMLac		BMG	
Temperatura (°C)	24	30	24	30	24	30	24	30	24	30

El análisis estadístico de las concentraciones y los rendimientos de proteínas extracelulares totales y hGH de las cepas productoras de hGH (KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K) se realizó en dos diseños experimentales, que se muestran en la **Tabla 20**, con un ANOVA bifactorial. En el primero se evaluó el efecto de la cepa y la temperatura, en el segundo, de la temperatura y la fuente de carbono inicial. También se llevó a cabo el análisis de los seis grupos resultantes de las combinaciones de los factores de cultivo (**Tabla 21**) con un ANOVA unifactorial con prueba de Tukey como *post-hoc*, de la forma previamente descrita para las cepas productoras de FTEII. Se emplearon las mismas herramientas descritas previamente para los análisis de las cepas productoras de FTEII. Las pruebas estadísticas de los tres diseños experimentales mencionados se realizaron dos veces, una para cada tiempo muestral (24 o 48 h).

**Tabla 20.** Diseños experimentales para la comparación de los datos obtenidos de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K.

<b>Diseño experimental 1</b>			<b>Diseño experimental 2</b>				
Comparación del efecto de cepa y temperatura.			Comparación del efecto de temperatura y FCI.				
Datos de BMG como FCI, no se incluyen datos de BMLac como FCI			Datos de la cepa KM71HGH22K-LAC, no se incluyen datos de KM71HGH22K.				
	30 °C (T <sub>1</sub> )	24 °C (T <sub>2</sub> )		BMG (FCI <sub>1</sub> )		BMLac (FCI <sub>2</sub> )	
KM71HGH22K-LAC (C <sub>1</sub> )	n = 3	n = 3	30 °C (T <sub>1</sub> )	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3
KM71HGH22K (C <sub>2</sub> )	n = 3	n = 3	24 °C (T <sub>2</sub> )	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3

Factores: C: cepa, T: temperatura, FCI: fuente de carbono inicial.  
Cada tiempo de inducción se evaluó por separado con ambos diseños.

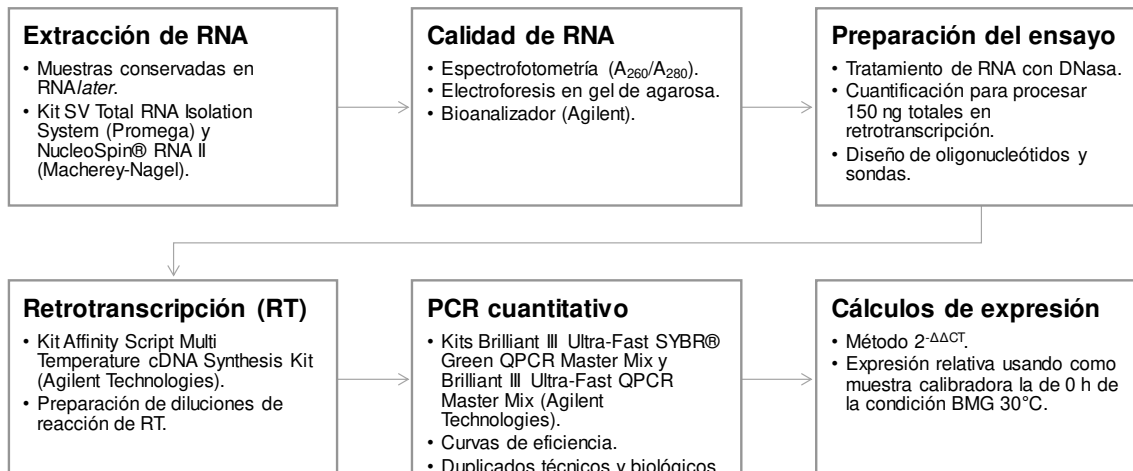
**Tabla 21.** Condiciones de cultivo de las cepas productoras de hGH.

Cepa	KM71HGH22K-LAC				KM71HGH22K	
Medio de cultivo de generación de biomasa	BMG		BMLac		BMG	
Temperatura (°C)	24	30	24	30	24	30

### 6.3.4. Evaluación de los niveles de expresión de genes regulados por los promotores *AOXI* y *GAP*, y de otros genes relacionados, mediante RT-qPCR

#### 6.3.4.1. Estrategia general

Se realizaron preparaciones de RNA total de las muestras obtenidas de los cultivos de inducción (6.3.4.2) y se determinó su calidad (6.3.4.3) para seleccionar las muestras que se incluirían en el análisis de RT-qPCR. Se prepararon las muestras antes de los análisis de RT-qPCR de la siguiente manera: se trataron las muestras con DNasa (6.3.4.4), tras lo cual se emplearon las muestras para la reacción de RT (6.3.4.5); se seleccionaron los genes a evaluar y se diseñaron oligonucleótidos (6.3.4.6), a los cuales se les evaluó su eficiencia de amplificación (6.3.4.9) y se estandarizó el ensayo con las muestras obtenidas (6.3.4.7). Finalmente, se llevaron a cabo los ensayos de qPCR (6.3.4.8), y se evaluó la expresión diferencial entre las muestras (6.3.4.10). Se incluye un diagrama de la metodología general de los ensayos de RT-qPCR en la **Figura 10**.



**Figura 10.** Metodología general de los ensayos de RT-qPCR.

#### 6.3.4.2. Preparación de muestras de RNA

La obtención de preparaciones de RNA se realizó a partir de las muestras de paquetes celulares tratados con RNA<sup>later</sup><sup>TM</sup> que se obtuvieron de los cultivos de inducción (6.3.3.3), utilizando los kits SV Total RNA Isolation System (Promega) (proceso descrito en 6.2.3.2) y NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel). Durante el proceso de extracción, se trabajó en un ambiente limpio y libre de nucleasas (campana de PCR) y se utilizaron tubos y puntillas nuevos y libre de nucleasas, así como micropipetas exclusivas para su uso en la extracción de RNA. Se utilizaron guantes de nitrilo y cubrebocas durante el proceso.

El procesamiento de las muestras para la obtención de RNA con el kit NucleoSpin® RNA II consistió en un tratamiento enzimático previo empleando lincasa y la extracción de RNA mediante kit. Para el tratamiento con lincasa, las células se resuspendieron en 90 µL de una solución amortiguadora con EDTA 0.1 M, sorbitol 1 M y β-mercaptoetanol 0.1 % preparada justo antes del tratamiento, tras lo cual se les añadió 50 U de lincasa y se incubaron a 30 °C por 1 h. Tras la incubación, a las muestras tratadas se les añadieron 350 µL de Buffer RA1 y 3.5 µL de β-mercaptoetanol y se procesaron en vórtex para lisar los esferoplastos. A continuación, se redujo la cantidad de restos celulares en la solución por filtración a través de filtros NucleoSpin (incluidos en el kit): la muestra se colocó en un filtro ensamblado en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó por 1 minuto a 11000 g.

El lisado filtrado se transfirió a un tubo nuevo de 2 mL. Se añadieron 350  $\mu$ L de etanol al 70 % al lisado y se mezcló el lisado con la micropipeta, para luego transferirse a una columna NucleoSpin RNA ensamblada en un tubo colector y centrifugarse por 30 s a 11000 g. Se colocó la columna en un tubo nuevo de 2 mL y se le añadieron 350  $\mu$ L de MDB (*Membrane Desalting Buffer*) y se centrifugó por 1 minuto a 11000 g para secar la membrana. Aparte, se preparó la mezcla de reacción de DNasa en un tubo estéril de 1.5 mL, añadiendo por cada muestra 10  $\mu$ L de rDNasa reconstituida y 90  $\mu$ L de buffer de reacción para DNasa. Se aplicaron 95  $\mu$ L de la mezcla de reacción de DNasa directamente al centro de la membrana de la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Luego se lavó la membrana para inactivar la DNasa añadiendo 200  $\mu$ L de buffer RAW2 a la columna, se centrifugó por 30 s a 11000 g y se colocó la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL. Se añadieron 600  $\mu$ L de buffer RA3 a la columna, se centrifugó por 30 s a 11000 g, se descartó el sobrenadante y se volvió a ensamblar la columna. Se añadieron 250  $\mu$ L de buffer RA3 a la columna, se centrifugó por 2 min a 11000 g para secar por completo la membrana y se colocó la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL libre de nucleasas. Se eluyó el RNA en 60  $\mu$ L de agua libre de RNasas y se centrifugó por 1 minuto a 11000 g. Las muestras de RNA obtenidas se almacenaron en congelación a -20 °C.

#### **6.3.4.3. Análisis de la calidad de las muestras de RNA**

La calidad de las muestras de RNA obtenidas se determinó por espectrofotometría con nano-espectrofotómetro (Nanophotometer, Implen), como se indica en el apartado **6.2.3.3.1**, y por electroforesis en gel de agarosa. El análisis de la integridad del RNA, determinada por el número de integridad de RNA (RIN), se realizó con el equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent) y el kit Agilent RNA 6000 Nano Kit, de la forma descrita en el apartado **6.2.3.3.2**. Las muestras de RNA con una concentración de RNA superior a 15 ng/ $\mu$ L y que mostraban bandas de RNA definidas como resultado de la electroforesis se seleccionaron para la generación de cDNA por RT. La concentración, calidad y los RIN obtenidos para las muestras seleccionadas para la RT se muestran en el **Anexo 4**.

#### **6.3.4.4. Tratamiento de las preparaciones de RNA con DNasa**

Las muestras de RNA seleccionadas para la generación de cDNA fueron tratadas con DNasa para eliminar el DNA residual que pudiese causar interferencia en los ensayos

de qPCR. Para el tratamiento de las muestras, se empleó la enzima RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Cat. M6101). Se trabajó en un ambiente limpio y libre de nucleasas, empleando material nuevo y libre de RNasas. En un tubo de 0.2 mL nuevo y libre de RNasas, se colocaron 24  $\mu$ L de la muestra de RNA a tratar, 3  $\mu$ L de buffer de reacción (incluido en el kit de la enzima) y 3  $\mu$ L de enzima RQ1 RNase-Free DNase. La mezcla anterior se incubó a 37 °C durante 1 h. Una vez terminada la incubación, se agregó 1  $\mu$ L de solución de paro de DNasa y se incubó durante 10 min a 65 °C.

#### **6.3.4.5. Síntesis de cDNA a partir de RNA (RT)**

A partir de las muestras de RNA tratadas con DNasa, se realizó un ensayo de RT por muestra. Para la síntesis del cDNA se utilizó el kit AffinityScript Multi Temperature cDNA Synthesis (Agilent). Se trabajó en un ambiente limpio y libre de nucleasas con material nuevo y libre de RNasas. En un tubo de 0.2 mL, se mezclaron 150 ng totales de RNA, 1  $\mu$ L de oligo (dT) (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L) y agua libre de RNasas para obtener un volumen final de 15.7  $\mu$ L. Cuando el volumen de muestra de RNA necesario para obtener 150 ng era muy pequeño para ser manejado con la micropipeta, se realizaba una dilución 1:10 de la muestra de RNA con agua libre de RNasas. La mezcla de RNA con oligo (dT) se incubó durante 5 min a 65 °C, transcurridos los cuales se dejó enfriar durante 10 min a temperatura ambiente antes de proseguir con el ensayo. Se realizó una segunda mezcla y se añadió a la primera con los siguientes reactivos para una preparación: 2.0  $\mu$ L de buffer de reacción 10X, 0.8  $\mu$ L de mix de dNTPs (25 mM), 0.5  $\mu$ L de inhibidor de RNasas (40 U/ $\mu$ L) y 1  $\mu$ L de enzima transcriptasa reversa AffinityScript Multiple Temperature. Los tubos se incubaron a 45 °C durante 1 h, para posteriormente incubarse a 70 °C por 15 min. De forma paralela a cada ensayo de síntesis de cDNA se llevó a cabo un ensayo como control negativo, que se realizó de la misma manera que la retrotranscripción, con la diferencia de que al control negativo no se le agregó la enzima transcriptasa reversa. Una vez obtenidas las muestras de cDNA, se realizaron diluciones a 1:25 empleando agua libre de RNasas en un volumen final de 50  $\mu$ L. El material se etiquetó y se almacenó a -20 °C.

#### **6.3.4.6. Diseño experimental y oligonucleótidos empleados para qPCR**

Para el diseño experimental de los genes a evaluar por RT-qPCR, se seleccionaron genes constitutivos que se emplearon como genes normalizadores (*G6PD* y *YPT1*), genes

regulados por el promotor *GAP* (*GAP* y el gen heterólogo *LAC4*), genes regulados por el promotor *AOX1* (el gen híbrido *aox1::ARG4* y los genes heterólogos *FTEII* y *HGH*), y genes que participan en el metabolismo de metanol (*AOX2* y *DAS*).

Se emplearon oligonucleótidos y sondas de hidrólisis para qPCR diseñados previamente en el grupo de trabajo para los genes *G6PD*, *YPT1*, *AOX2*, *GAP*, *FTEII* (Félix-Castro 2013), *LAC4* (Herrera-Estala 2015), *HGH* (Balderas-Cisneros 2016); y para el gen *aox1::ARG4* se diseñaron oligonucleótidos como se describe en el apartado

**6.3.4.6.1.** La secuencia de los oligonucleótidos empleados se muestra en la **Tabla 22**.

**Tabla 22.** Oligonucleótidos y sondas empleados en los ensayos de qPCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
5qG6PD	TTAAGCCAGGTTCTAAATGTGTCA
3qG6PD	TTCCACCTTTCTGTGTTGA
5qYPT1	GCGGTCAAGCTAGTGCTTCT
3qYPT1	TGCTGACAAAACGTAACCA
5qLac4	ACCACCACTAACAATGATGAACCAA
3qLac4	AACAGTAACAACAGCCAAAGATCCA
5qAOX1ARG4*	AATTGCGACTGGTTCCAATTGAC
3qAOX1ARG4	TCGGGGATAGCCATCGTTTCG
3HGHgs	GAATTGAACTGGCTCCAACC
5HGHgs	GAGCTCACAGATTGCACCAA
3qAOX2	TGTAGTCAATACAGTTGATCCGAAA
5qAOX2	ACGGGCTTTTAACTACATTGTTCT
5qDAS	TGATGCTTGTGCAAGAGG
3qDAS	GACGGAACCATCACAACAAA
GAP Oligonucleótido 5q	TTCCATCTTCCACTGGTGCT
GAP Oligonucleótido 3q	TTGGGACACGGAAAGCCAAA
GAP Sonda de hidrólisis	CCAGAATTGAACGGTAAGCTGA
FTEII Oligonucleótido 5q	TCCAAATCACTGACGGTCCAGA
FTEII Oligonucleótido 3q	TCACCGTCTTGAGCAACGAACA
FTEII Sonda de hidrólisis	TTTGGGTTTCGGTTTGGGTCCAGA

\*El transcrito del gen *AOX1* en las cepas KM71 de *P. pastoris* se interrumpe por *ARG4* de *S. cerevisiae*.

Para el análisis de los genes *GAP* y *FTEII* se emplearon sondas de hidrólisis, cuyo diseño se realizó previamente en el grupo de trabajo y que ya habían sido sintetizadas y probadas (Félix-Castro 2013). Se usaron sondas de hidrólisis en lugar de oligonucleótidos debido a que previamente se habían detectado inespecificidades en los ensayos de qPCR al emplear oligonucleótidos para amplificar las secuencias de *GAP* y *FTEII* con SYBR Green como agente fluorogénico. Las sondas provienen de los kits PrimeTime Mini qPCR Primer Assay (Integrated DNA Technologies), los cuales consisten en un par de oligonucleótidos, y una sonda marcada en el extremo 5' con FAM (colorante fluorescente) y en el extremo 3' con ZEN/3' Iowa Black FQ (“quencher”).

### 6.3.4.6.1. Diseño de oligonucleótidos para análisis del gen *aox1::ARG4* por qPCR

El diseño de oligonucleótidos específicos para el gen híbrido *aox1::ARG4* de las cepas de *P. pastoris* KM71 empleó la secuencia de *aox1::ARG4* determinada al analizar las secuencias de los transcriptomas de la cepa de *P. pastoris* KM71LAC412. Para el diseño de los oligonucleótidos para qPCR, se consideraron los primeros 388 nucleótidos a partir del codón de inicio de la sección 5' de *AOX1* del gen *aox1::ARG4*, con el fin de detectar la secuencia transcrita más cercana al promotor y en la que no interfiere el gen *ARG4*.

El diseño de oligonucleótidos se realizó con el programa Primer3web, versión 4.1.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) (Untergasser et al. 2012), siguiendo parámetros utilizados previamente en el grupo de trabajo (Herrera-Estala 2015), los cuales se muestran en la **Tabla 23**.

**Tabla 23.** Parámetros para el diseño de oligonucleótidos específicos para qPCR en Primer 3.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	
Primer Size	Min	18	Table of thermodynamic parameters	SantaLucia 1998
	Opt	20	Product Size Ranges	100-150
	Max	36	Concentration of Monovalent Cations	100
Primer Tm	Min	64	Salt Correction Formula	Santa Lucia 1998
	Opt	66	Concentration of Divalent Cations	5.5
	Max	68	Concentration of dNTPs 1	1
Max Tm Difference	5.0	Annealing Oligo Concentration	50.0	

Se verificó que la  $T_m$  de los oligonucleótidos estuviera entre 65.8 y 68.5 °C, con OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) (Owczarzy et al. 2008) utilizando como datos de entrada, además de la secuencia del oligonucleótido, los siguientes parámetros: oligonucleótido 0.3  $\mu$ M,  $\text{Na}^+$  100 mM,  $\text{Mg}^{+2}$  5.5 mM y dNTPs 1 mM.

Se analizó la posible formación de estructuras secundarias (horquillas, homodímeros y heterodímeros) por parte de los oligonucleótidos por medio de la OligoAnalyzer 3.1. Se introdujeron al programa las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para determinar el valor de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) en kcal/mol de las posibles estructuras secundarias que podrían formar los mismos. Se revisó que el valor de

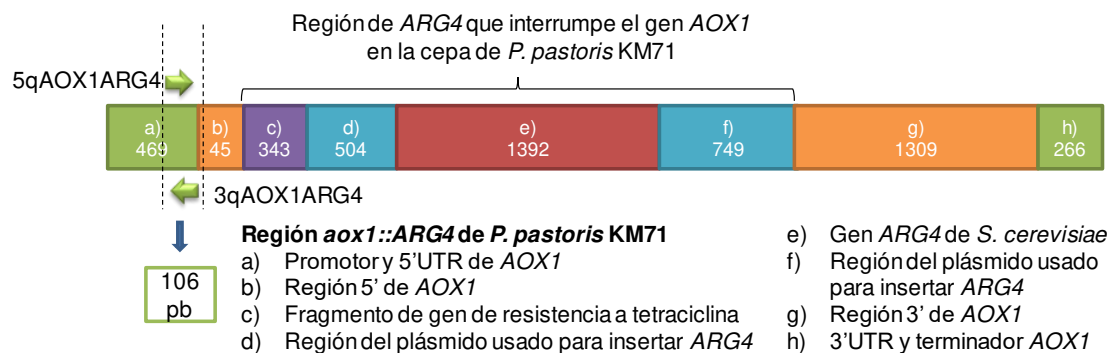
$\Delta G$  no fuera menor a -10 kcal/mol, bajo los mismos parámetros empleados para el cálculo de la  $T_m$  con OligoAnalyzer 3.1, en caso contrario se descartó el oligonucleótido diseñado.

Para evaluar la especificidad de los oligonucleótidos, se alinearon contra el genoma de *P. pastoris* GS115 utilizando blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), y empleando como información de entrada las secuencias de los pares de oligonucleótidos diseñados. Para determinar la especificidad de los oligonucleótidos se tomó en cuenta la hibridación de ambos oligonucleótidos en la misma secuencia blanco, y que los oligonucleótidos no hibridaran en otros sitios del genoma.

Una vez que se evaluaron las propiedades de los oligonucleótidos diseñados y que se revisó que cumplieran con las especificaciones indicadas, se solicitó su síntesis a la compañía Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, Iowa).

#### 6.3.4.6.2. Verificación de oligonucleótidos diseñados para qPCR de la región *aox1::ARG4*

La verificación de la amplificación de los oligonucleótidos 5qAOX1ARG4 y 3qAOX1ARG4 diseñados para qPCR (6.3.4.6.1), se realizó mediante PCR dirigida a preparaciones de cDNA. Se elaboraron dos mezclas de reacción: una de éstas con los oligonucleótidos 5qAOX1ARG4 y 3qAOX1ARG4 y la otra con los oligonucleótidos 5qG6PD y 3qG6PD (ver **Tabla 22**), esta última serviría como control positivo de la amplificación. El tamaño esperado del producto de PCR de los oligonucleótidos qAOX1ARG4 es de 106 pb, el de los oligonucleótidos qG6PD es de 68 pb. El sitio de amplificación de los oligonucleótidos qAOX1ARG4 se muestra en la **Figura 11**.



**Figura 11.** Esquema de amplificación de los oligonucleótidos 5qAOX1ARG4 y 3q AOX1ARG.



Las mezclas de reacción se realizaron como se describe en la **Tabla 24**, empleando un volumen de tres reacciones para la mezcla de oligonucleótidos de qAOX1ARG4 (columna Volumen x3), y de cuatro reacciones para la mezcla de oligonucleótidos de qG6PD (columna Volumen x4). Posteriormente, cada mezcla se distribuyó en alícuotas de 19  $\mu\text{L}$  en tubos de 0.2 mL nuevos y estériles y a cada una se le añadió 1  $\mu\text{L}$  de una de las siguientes preparaciones (preparaciones 1 a 4 se emplearon con la mezcla de oligonucleótidos qG6PD, y preparaciones 2 a 4 se emplearon con la mezcla de oligonucleótidos qAOX1ARG4): 1) control negativo de RT (RNA sin retrotranscriptasa en la reacción de RT para determinar la amplificación de fondo por DNA genómico) del RNA de H-L 24 °C BMLac 48 h (matraz 1), 2) cDNA obtenido por RT del RNA de H-L 24 °C BMG 48 h (matraz 1) (se empleó una dilución 1:5 para la PCR), 3) cDNA obtenido por RT del RNA de H-L 24 °C BMLac 48 h (matraz 1) (se empleó una dilución 1:5 para la PCR), 4) DNA obtenido directamente de una colonia de KM71pPIC9 tratada con liticasa (misma muestra empleada en el apartado **6.2.3.4.2**). Las reacciones se introdujeron al termociclador con el programa que se muestra en la **Tabla 25** y se analizaron por electroforesis.

**Tabla 24.** Volúmenes de reactivos para PCR para verificación de oligonucleótidos para qPCR de *aox1::ARG4*.

Reactivo	Volumen x1 ( $\mu\text{L}$ )	Volumen x3 ( $\mu\text{L}$ )	Volumen x4 ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O Milli-Q	7.78	23.34	31.12
Buffer Green GoTaq 5X (Promega)	4	12	16
Mix de oligonucleótidos de qPCR*	6.66	19.98 <sup>A</sup>	26.64 <sup>B</sup>
dNTP (Bioline) (10 mM)	0.4	1.2	1.6
GoTaq DNA Polimerasa (Promega) (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.16	0.48	0.64
DNA	1	-	-
Volumen total de reacción	20		

\*Previamente se preparó una mezcla de oligonucleótidos de la forma que se indica en los puntos A y B.

A: Mezcla qAOX1ARG4: 30  $\mu\text{L}$  de 5qAOX1ARG4 3  $\mu\text{M}$  + 30  $\mu\text{L}$  de 3qAOX1ARG4 3  $\mu\text{M}$

B: Mezcla qG6PD: 30  $\mu\text{L}$  de 5qG6PD 3  $\mu\text{M}$  + 30  $\mu\text{L}$  de 3qG6PD 3  $\mu\text{M}$

**Tabla 25.** Programa de termociclador empleado en la PCR para verificación de oligonucleótidos para qPCR de *aox1::ARG4*.

Ciclos	Temperatura (°C)	Duración (min)
1	94.0	2:00
30	94.0	1:00
	55.0	1:00
	72.0	1:00
1	72.0	5:00

#### **6.3.4.7. Estandarización del ensayo de qPCR**

Para cada muestra de cDNA evaluada se hicieron reacciones qPCR por duplicado. También se realizaron controles para qPCR empleando los negativos de la RT de cada muestra. Estos no se realizaron por duplicado y únicamente se realizaron con un par de oligonucleótidos por muestra, debido a que solo se quería estimar si el DNA contenido no interferiría con el ensayo de qPCR. Además, se realizaron controles negativos de qPCR, en los cuales se sustituyó el cDNA por agua libre de nucleasas. En cada corrida de ensayos, se prepararon controles negativos de qPCR por cada par de oligonucleótidos empleados, por lo que se procuró realizar cada corrida para evaluar uno o dos genes de varias muestras de cDNA.

Para verificar que las muestras de cDNA fueran aptas para los ensayos de qPCR, primero se realizó una prueba preliminar como se describe a continuación. Se evaluaron por qPCR por duplicado las diluciones 1:25 de las muestras de cDNA y sus respectivos controles negativos de la RT sin diluir, empleando los oligonucleótidos específicos para el gen normalizador *G6PD*. También se incluyó un control negativo de qPCR para descartar la contaminación de los reactivos. El procedimiento técnico del ensayo se realizó como se describe en el apartado **6.3.4.8**. Una vez obtenidos los resultados, si la dilución de cDNA presentaba un  $C_T$  contenido en el rango de linealidad de *G6PD* y si el valor de  $C_T$  para el control negativo era superior a 30, la muestra se utilizaba para realizar los análisis con el resto de los genes seleccionados. Si el  $C_T$  de la dilución no se encontraba dentro del rango, se repetía el ensayo con una dilución 1:5 a partir del cDNA original (en caso de que el  $C_T$  fuera mayor al rango) o con una dilución 1:125 (si el  $C_T$  era menor).

#### **6.3.4.8. Procedimiento técnico para la realización de los ensayos de qPCR**

La preparación de las reacciones de qPCR se llevó a cabo en un ambiente limpio y libre de nucleasas, en una campana de PCR. Se evitó la exposición directa de los reactivos a la luz durante la preparación, debido a que el SYBR Green es fotosensible. Se emplearon puntillas, tubos y tapas ópticas (Agilent Technologies) nuevos y libres de nucleasas, y se emplearon guantes de nitrilo durante el proceso.

Para realizar las reacciones de evaluación de las muestras de cDNA con oligonucleótidos que emplearon SYBR Green, se utilizaron los volúmenes de reactivos descritos en la **Tabla 26** por cada reacción (se considerará como un volumen de reacción).

**Tabla 26.** Mezcla de trabajo utilizada para el volumen de una sola reacción en el ensayo de qPCR con SYBR Green para muestras de cDNA.

Reactivos	Volumen 1X (μL)
Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green (2X)	10
Agua libre de nucleasas	4
Oligonucleótido 5' (solución de trabajo 3 μM)	2
Oligonucleótido 3' (solución de trabajo 3 μM)	2
Dilución de cDNA	2
Volumen total de la reacción	20

Los reactivos utilizados en la preparación de la mezcla de reacción para analizar las muestras de los controles negativos, que son los de la RT y de qPCR, con oligonucleótidos que emplearon SYBR Green, se muestran en la **Tabla 27**. La mezcla emplea los mismos reactivos que la del análisis por qPCR de los cDNA, pero con la mitad del volumen.

**Tabla 27.** Mezcla de trabajo utilizada para el volumen de una sola reacción en el ensayo de qPCR con SYBR Green para controles negativos de la RT y de qPCR.

Reactivos	Volumen 1X (μL)
Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green (2X)	5
Agua libre de nucleasas	2
Oligonucleótido 5' (solución de trabajo 3 μM)	1
Oligonucleótido 3' (solución de trabajo 3 μM)	1
Control negativo de retrotranscripción*	1
Volumen total de la reacción	10

\*Sustituir por agua libre de nucleasas para el control negativo del qPCR.

Al momento de preparar las reacciones, se realizaron mezclas de los reactivos comunes a cada reacción y luego se repartió el volumen correspondiente a cada reacción en tubos. Un ejemplo de esto se encuentra en la **Figura 12**, en donde el ejemplo 1 muestra una reacción en la que se incluye el análisis de los controles negativos de RT, y el ejemplo 2 muestra un análisis con dos pares de oligonucleótidos. Se debe mencionar que, si el volumen del coctel era menor a 200 μL, éste se realizaba directamente en los tubos donde distribuiría el coctel, dejando el volumen restante del coctel tras distribuir las reacciones completas como la mezcla para el control negativo de qPCR. En caso contrario, el coctel se preparaba en tubos de 0.6 o 2 mL nuevos y libres de nucleasas, de acuerdo con el volumen total.

## EJEMPLO 1

Para analizar con un par de oligonucleótidos:

30 muestras de cDNA  
(por duplicado: 60 reacciones)

30 controles negativos de RT  
(30 medias reacciones)

1 control negativo de qPCR  
(1 media reacción)

Media reacción extra  
(para asegurar el volumen  
completo de las reacciones)

Se requiere el volumen de 76 reacciones completas

Realizar coctel

Reactivos	Volumen x76 (µL)
Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green (2X)	760
Agua libre de nucleasas	304
Oligonucleótido 5' (3 µM)	152
Oligonucleótido 3' (3 µM)	152
Volumen total del coctel	1638

Distribuir el coctel:

- 60 tubos con 18 µL
- 31 tubos con 9 µL

Añadir:

- 2 µL de dilución de cDNA a los tubos con 18 µL
- 1 µL de control negativo de RT o 1 µL de agua libre de nucleasas (para el control negativo de qPCR) a los tubos con 9 µL

## EJEMPLO 2

Para analizar con dos pares de oligonucleótidos:

10 muestras de cDNA con el  
par de oligonucleótidos A  
(por duplicado: 20 reacciones)

4 muestras de cDNA con el par  
de oligonucleótidos B  
(por duplicado: 8 reacciones)

2 controles negativos de qPCR  
(2 medias reacciones)

2 reacciones extra (una por  
coctel, para asegurar el volumen  
completo de las reacciones)

Se requiere el volumen de 21 reacciones completas para  
el coctel con oligonucleótido A, y el de 9 reacciones  
completas para el coctel con oligonucleótido B

Realizar dos cocteles (uno por cada par de oligonucleótidos)

Se realizan 2 cocteles desde el inicio para minimizar la transferencia de SYBR Green  
entre tubos y evitar pérdidas de volumen

Reactivos	Coctel con par de oligonucleótidos A Volumen x21 (µL)	Coctel con par de oligonucleótidos B Volumen x9 (µL)
Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green (2X)	210	90
Agua libre de nucleasas	84	36
Oligonucleótido 5'* (3 µM)	42	18
Oligonucleótido 3'* (3 µM)	42	18
Volumen total del coctel	378	163

\*Cambiar los oligonucleótidos según el coctel

Añadir:

- 2 µL de dilución de cDNA a los tubos con 18 µL
- 1 µL de agua libre de nucleasas a los tubos con 9 µL

Distribuir coctel A:

- 20 tubos con 18 µL
- 1 tubo con 9 µL

Distribuir coctel B:

- 8 tubos con 18 µL
- 1 tubo con 9 µL

**Figura 12.** Ejemplos para la preparación de reacciones para qPCR con SYBR Green.

Para realizar las reacciones de evaluación de las muestras de cDNA con sondas de hidrólisis, para el análisis de los genes *GAP* y *FTEII*, se utilizaron los reactivos descritos en la **Tabla 28** por cada reacción. Estas corresponden a un volumen completo de reacción.

**Tabla 28.** Mezcla de trabajo utilizada para el volumen de una sola reacción en el ensayo de qPCR con sondas de hidrólisis para muestras de cDNA.

Reactivos	Volumen 1X (µL)
Brilliant III Ultra-Fast qPCR Master Mix (2X)	10
Kit PrimeTime Mini ( <i>GAP</i> o <i>FTEII</i> )	4
Agua libre de nucleasas	4
Dilución de cDNA	2
Volumen total de la reacción	20

Los reactivos utilizados en la preparación de la mezcla de reacción para analizar las muestras de los controles negativos de qPCR, con sondas de hidrólisis, se muestran en la **Tabla 29**. La mezcla usó los mismos reactivos que la del análisis por qPCR de los cDNA, pero con la mitad del volumen. No se realizaron reacciones para controles negativos de la RT, puesto que se analizaron con otro par de oligonucleótidos y SYBR Green.

**Tabla 29.** Mezcla de trabajo utilizada para el volumen de una sola reacción en el ensayo de qPCR con sondas de hidrólisis para el control negativo de qPCR.

Reactivos	Volumen 1X (µL)
Brilliant III Ultra-Fast qPCR Master Mix (2X)	5
Kit PrimeTime Mini ( <i>GAP</i> o <i>FTEII</i> )	2
Agua libre de nucleasas	3
Volumen total de la reacción	10

Todas las reacciones se colocaron en tubos ópticos especiales (en presentación de tiras de 8 tubos) (Agilent Technologies, Cat. 401428), los cuales fueron cerrados con tapas ópticas especiales (en presentación de tiras de 8 tapas) (Agilent Technologies, Cat. 401425). Los tubos con las reacciones se centrifugaron en una minicentrífuga (Kinetic Energy 26 Joules Galaxy Mini Centrifuge, VWR) durante 10 s para eliminar burbujas que pudieran interferir con las lecturas, y después se colocaron en la placa del termociclador Mx3005P QPCR System de Agilent Technologies.

El programa de temperaturas y duración de los ciclos de qPCR programado en el termociclador para las reacciones con SYBR Green se muestra en la **Tabla 30**, y para las reacciones con sondas de hidrólisis, en la **Tabla 31**. Para las reacciones con SYBR Green se agregó un tercer segmento en el programa, correspondiente a las curvas de disociación. Se validó empíricamente la especificidad de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de qPCR verificando la presencia de un solo pico en el gráfico de las curvas de disociación generadas por el equipo.

**Tabla 30.** Programa del termociclador para el ensayo de qPCR con oligonucleótidos y SYBR Green.

Ciclos	Duración (min)	Temperatura	Pasos de qPCR
1	3:00	95 °C	Incubación
40	0:20	95 °C	Desnaturalización
	0:20	60 °C	Hibridación y extensión
1	1:00	95 °C	Desnaturalización de amplicones
	0:30	55 °C	Hibridación
	0:30	95 °C	Incremento gradual hasta llegar a 95 °C

**Tabla 31.** Programa del termociclador para el ensayo de qPCR con sondas de hidrólisis.

Ciclos	Duración (min)	Temperatura
1	3:00	95 °C
40	0:20	95 °C
	0:20	60 °C

#### **6.3.4.9. Curvas estándar para la determinación de la eficiencia de amplificación en los ensayos de qPCR para cada uno de los genes seleccionados**

La eficiencia de amplificación (E) de cada par de oligonucleótidos se obtuvo de trabajos previos (Félix-Castro 2013), de estudios en el grupo de trabajo, y realizando la calibración para determinar la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos específicos para los genes *LAC4* y *aox1::ARG4*.

La determinación de la eficiencia de amplificación se ejecutó de la forma que se describe a continuación. Se hicieron ensayos de qPCR por duplicado, de acuerdo al protocolo descrito previamente (6.3.4.8) con diluciones seriadas del cDNA 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 y 1:3125 para el gen *LAC4*, y con el cDNA directo y diluciones 1:5, 1:10, 1:25, 1:100, 1:125, 1:200 y 1:625 para el gen *aox1::ARG4*. Las diluciones se prepararon con agua libre de nucleasas partiendo del cDNA directo. Las diluciones para la evaluación del gen *LAC4* provinieron del cDNA sintetizado de la muestra de RNA de la cepa KM71FTEII-LAC cultivada en BMLac inicial a 24 °C a 24 h de inducción (matraz 2). Las diluciones para la evaluación del gen *aox1::ARG4* provinieron de la muestra de la cepa KM71HGH22K cultivada en BMG inicial a 30 °C a las 48 h de inducción (matraz 1).

Una vez obtenidos los resultados del ensayo, por cada gen analizado, se graficaron en el eje de las abscisas los logaritmos en base 10 de la cantidad de RNA (ng) en la reacción, y en eje de las ordenadas el valor  $C_T$  promedio de las reacciones por duplicado, empleando un umbral de 2000. Se obtuvo la línea de tendencia con un ajuste lineal a partir de los datos graficados, junto con la ecuación de la recta y el valor de  $r^2$ . A partir de la gráfica obtenida se determinaron la eficiencia de amplificación, linealidad e intervalos de linealidad para los genes *LAC4* y *aox1::ARG4* en los ensayos de qPCR. Se consideró un valor de  $r^2$  mayor a 0.98 y los intervalos limitantes de la curva de dilución fueron considerados como los valores de  $C_T$  aceptables para calcular los niveles de expresión de cada gen.

La eficiencia de amplificación (E) se determinó a partir de la pendiente de la recta (m) de la gráfica descrita anteriormente empleando la **Ecuación 5**, considerando como criterio de aceptación un valor superior al 90 % y menor del 110 %. Las curvas de eficiencia de los genes *LAC4* y *aox1::ARG4* se incluyen en el **Anexo 5**.

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

**Ecuación 5.** Cálculo de la eficiencia de amplificación.

### 6.3.4.10. Cálculo de la expresión de los genes analizados

Para realizar el cálculo de la expresión relativa de los genes en estudio, se usó el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen 2001). Este método calcula la cantidad de blanco, normalizado a un control endógeno y relativo a un calibrador, e incluye una modificación para considerar en el cálculo los valores de las eficiencias de amplificación de cada gen y los factores de dilución de los cDNA empleados en los ensayos de qPCR. El cálculo de los niveles de expresión relativa por este método se realizó empleando la **Ecuación 6**, cuyas variables se describen en la **Tabla 32**.

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{FD_{X,q}(1 + E_X)^{-(C_{T,X,q})}}{FD_{X,cb}(1 + E_X)^{-(C_{T,X,cb})}} \div \frac{FD_{R,q}(1 + E_R)^{-(C_{T,R,q})}}{FD_{R,cb}(1 + E_R)^{-(C_{T,R,cb})}}$$

**Ecuación 6.** Cálculo de la expresión relativa incluyendo eficiencias de amplificación y factores de dilución.

**Tabla 32.** Descripción de las variables de la **Ecuación 6**.

Variable	Descripción
$X_{N,q}$	Cantidad normalizada de moléculas blanco en cualquier muestra.
$X_{N,cb}$	Cantidad normalizada de moléculas blanco en la muestra calibradora.
$C_{T,X,q}$	Ciclo umbral de la amplificación de las moléculas blanco en cualquier muestra.
$C_{T,X,cb}$	Ciclo umbral de la amplificación de las moléculas blanco en la muestra calibradora.
$C_{T,R,q}$	Ciclo umbral de la amplificación de las moléculas de referencia en cualquier muestra.
$C_{T,R,cb}$	Ciclo umbral de la amplificación de las moléculas de referencia en la muestra calibradora.
$E_X$	Eficiencia de la amplificación de las moléculas de blanco.
$E_R$	Eficiencia de la amplificación de las moléculas de referencia.
$FD_{X,q}$	Factor de dilución de la molécula blanco en cualquier muestra.
$FD_{X,cb}$	Factor de dilución de las moléculas blanco en cualquier muestra.
$FD_{R,q}$	Factor de dilución de la molécula de referencia en la muestra calibradora.
$FD_{R,cb}$	Factor de dilución de las moléculas de referencia en la muestra calibradora.

Asimismo, se realizó una cuantificación absoluta de los genes *GAP*, *LAC*, *FTEII*, *HGH*, *aox1::ARG4* y *AOX2* empleando los datos de  $C_T$  de las muestras analizadas. Se usó la fórmula descrita en la ecuación, donde  $X_o$  es la cantidad de RNA de la muestra,  $X_t$  en la cantidad de RNA al ciclo umbral,  $E$  es la eficiencia de amplificación y  $C_{Tm}$  es el  $C_T$  de la muestra problema.

$$X_o = X_t(1 + E)^{-C_{Tm}}$$

**Ecuación 7.** Cálculo para la cuantificación absoluta de la expresión de genes por qPCR.

Los valores de la cantidad de RNA al ciclo umbral ( $X_t$ ) y de la eficiencia de amplificación ( $E$ ) se calcularon con los datos de la pendiente ( $m$ ) y la ordenada al origen ( $b$ ) de las rectas utilizadas para determinar la eficiencia de la amplificación de los genes (**Figura 106** y **Figura 107** del **Anexo 5** y datos en **Tabla 33**). La fórmula para el cálculo de  $X_t$  se muestra en la **Ecuación 8**.

$$X_t = 10^{-\frac{b}{m}}$$

**Ecuación 8.** Cálculo de cantidad de RNA al ciclo umbral ( $X_t$ ).

A partir de la **Ecuación 6** se creó una plantilla en Microsoft Excel, la cual empleó como datos de entrada los valores de  $C_T$  por duplicado de los genes *G6PD*, *YPT1* (ambos genes normalizadores), *GAP*, *LAC4*, *FTEII*, *HGH*, *AOX2* y *DAS*, y un valor de  $C_T$  del gen *aox1::ARG4* de cada muestra de cDNA obtenida de los cultivos de inducción (entre los que se incluyen los datos de las muestra calibradoras), y la eficiencia de amplificación de los genes en estudio. Los datos resultantes (**Tabla 120** del **Anexo 5**) se emplearon en la mayoría de las comparaciones entre las condiciones y tiempos de cultivo descritas en los resultados, a menos que se indique lo contrario. De igual forma, se creó una plantilla a partir de la **Ecuación 7** con los datos de los genes *GAP*, *LAC*, *FTEII*, *HGH*, *aox1::ARG4* y *AOX2*, y los datos resultantes se usaron para comparar los niveles de expresión entre dos genes distintos, siempre y cuando la cantidad de RNA en el ensayo de los genes fuera la misma, en caso contrario se realizó el ajuste correspondiente tomando en cuenta los factores de dilución de las muestras.



La eficiencia de amplificación se obtuvo de estudios previos en donde se realizó la recta de calibración. Para el presente estudio se requirió calcular la eficiencia de amplificación de los genes *LAC4* y *aox1::ARG4*, el proceso empleado se describió en el apartado **6.3.4.9**. La eficiencia de amplificación de los genes, así como el umbral que se usó para determinar el  $C_T$  se muestran en la **Tabla 33**.

**Tabla 33.** Parámetros empleados en los cálculos de expresión de los genes analizados.

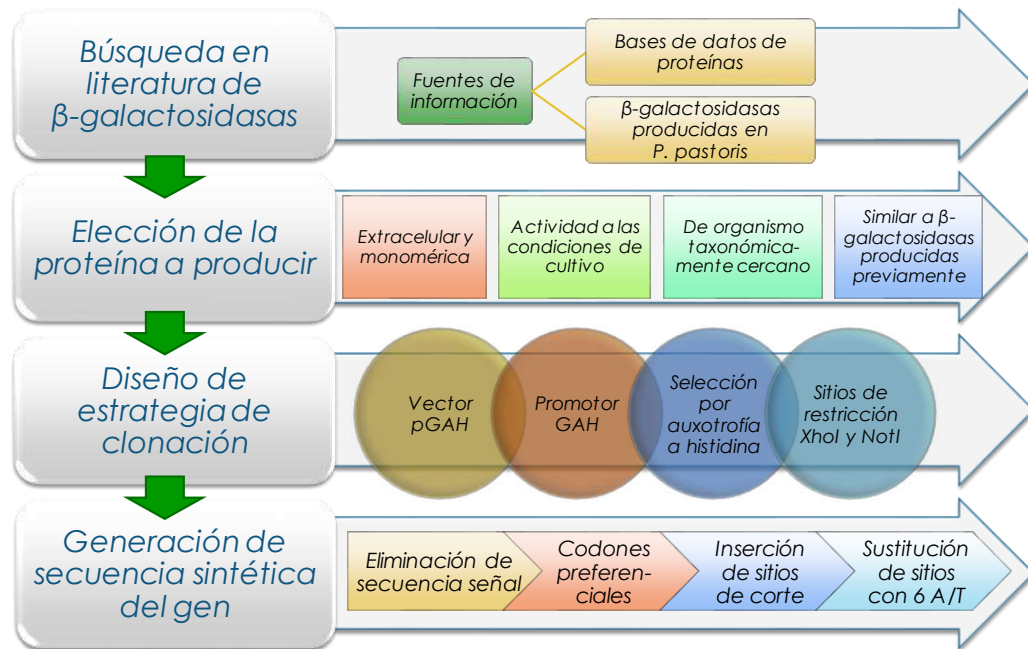
Gen	Eficiencia (%)	Linealidad ( $r^2$ )	Pendiente*	Ordenada al origen	Intervalo de linealidad ( $C_T$ )		Umbral (dR)
<i>G6PD</i>	93.10	0.992	-3.349	26.21	24.61	33.97	2000
<i>YPT1</i>	94.40	0.984	-3.273	27.12	25.56	34.71	2000
<i>GAP</i>	94.00	1.000	-3.531	<i>31.60</i>	25.08	35.32	2000
<i>FTEII</i>	92.50	0.991	-3.580	<i>24.76</i>	18.91	28.70	2000
<i>HGH</i>	97.60	0.994	-3.330	25.31	23.72	33.03	2000
<i>LAC4</i>	100.87	0.996	<u>-3.301</u>	<u>22.61</u>	20.85	30.03	2000
<i>AOX2</i>	94.70	0.992	-3.456	<i>27.44</i>	22.69	32.36	2000
<i>DAS</i>	90.00	0.998	-3.459	24.34	19.35	29.41	2000
<i>aox1::ARG4</i>	91.65	0.997	<u>-3.539</u>	<u>29.500</u>	25.47	35.10	2000

\*Los datos de pendiente y ordenada al origen se obtuvieron de las rectas de calibración realizadas en este estudio (subrayadas), previamente en el grupo de trabajo (itálicas) o empleando la ecuación de la recta que corta los dos puntos de intervalo de linealidad.

## **6.4. OBJETIVO 3. Construcción de una cepa de *P. pastoris* productora de una $\beta$ -galactosidasa extracelular**

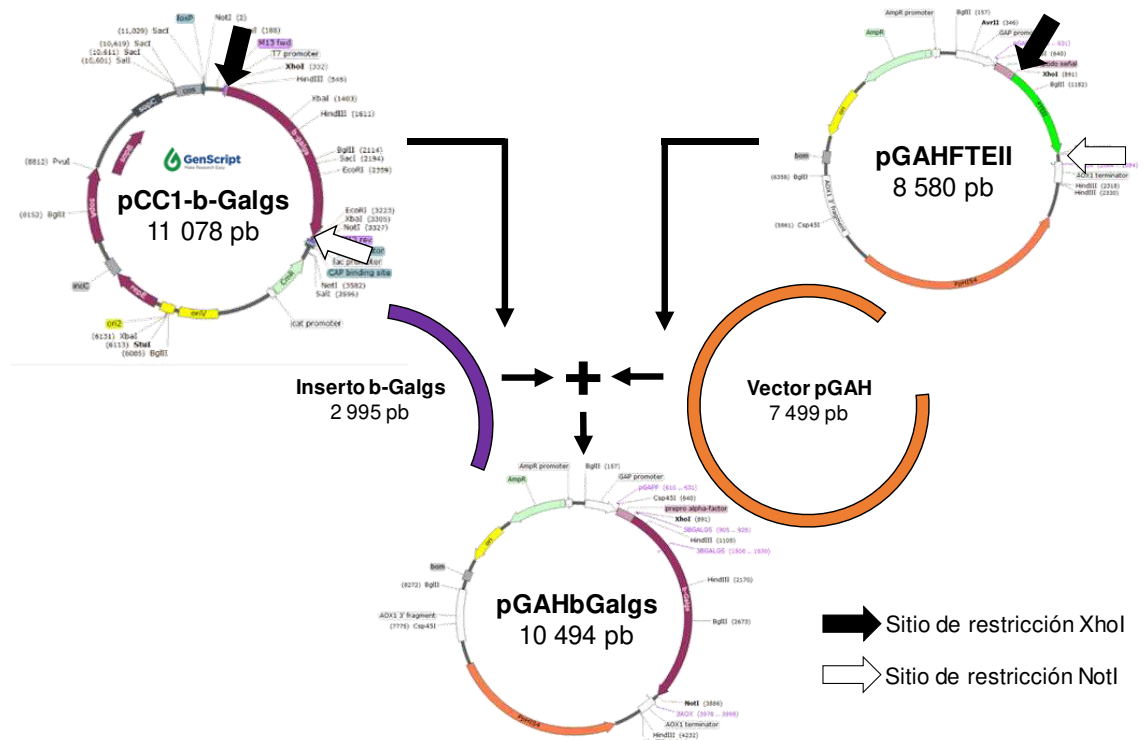
### **6.4.1. Estrategia general**

Para realizar el diseño de construcción de una cepa de *P. pastoris* capaz de producir una  $\beta$ -galactosidasa extracelular funcional, se llevó a cabo un análisis de la literatura existente para identificar la  $\beta$ -galactosidasa con las características más adecuadas para este propósito, las cuales se indican en el apartado **6.4.3**. Una vez seleccionada, se realizaron cambios a la secuencia para permitir su clonación en el vector seleccionado y para modificar su secuencia codificante con codones preferenciales para *P. pastoris*, de la forma que se describe en el apartado **6.4.3.2**. Un esquema de la estrategia general se muestra en la **Figura 13**.



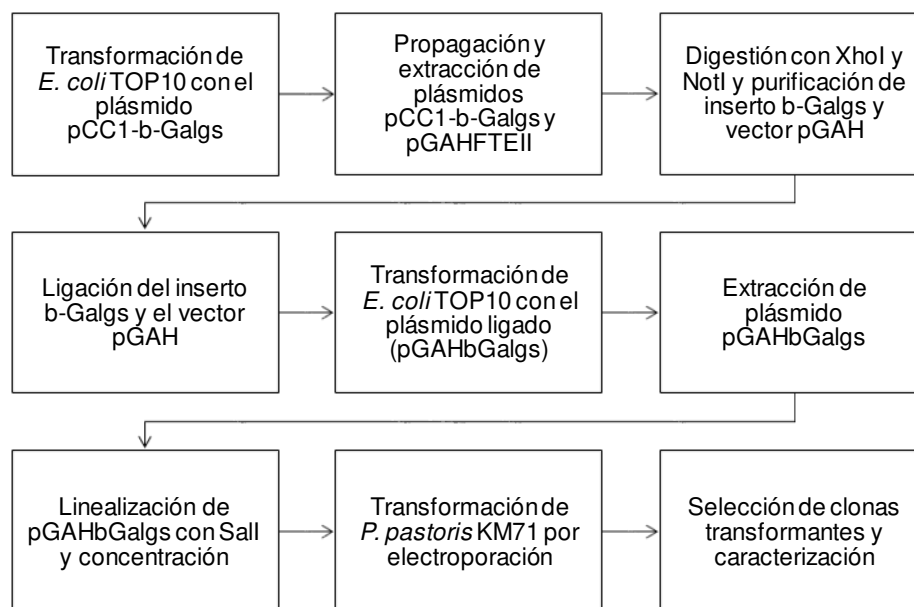
**Figura 13.** Estrategia general de selección y modificación de la secuencia del gen de  $\beta$ -galactosidasa que se buscó expresar en *P. pastoris*.

Para la estrategia general de clonación se empleó el vector pGAH, generado previamente en el grupo de trabajo (Herrera-Estala 2015). Este vector es similar a los vectores de la familia pGAPZ $\alpha$ , pero tiene como diferencias un promotor GAP mutado, una secuencia señal modificada con codones preferenciales para *P. pastoris* y el gen *HIS4* como marcador de selección, que permite la selección de la cepa al reestablecer la capacidad de las células transformadas de crecer en medio mínimo sin histidina. El uso del vector pGAH permitiría la expresión constitutiva y extracelular del gen de  $\beta$ -galactosidasa seleccionado. El vector pGAH se obtuvo a partir del plásmido pGAHFTEII (Herrera-Estala 2015), mediante una reacción de restricción con las enzimas XhoI y NotI. El inserto con la secuencia de  $\beta$ -galactosidasa (inserto b-Galgs) se obtuvo aplicando el mismo procedimiento de restricción al plásmido pCC1-b-Galgs (conteniendo la secuencia sintética del gen de  $\beta$ -galactosidasa). La secuencia del gen sintético se modificó con una serie de elementos génicos que permitirían la clonación en el vector pGAH, que se llevó a cabo mediante la inserción de la región codificante del gen a través de corte con las enzimas de restricción XhoI y NotI, y la posterior ligación de la región codificante en el vector de expresión. La estrategia de clonación se esquematiza en la **Figura 14**.



**Figura 14.** Estrategia para la construcción del vector pGAHbGalgs. Las flechas indican los sitios de restricción XhoI (en negro) y NotI (en blanco).

Una vez obtenido el plásmido con la secuencia del gen sintético de  $\beta$ -galactosidasa, el cual se designó como pGAHbGalgs, se linealizó con la enzima de restricción Sall, y se empleó para transformar por electroporación células de *P. pastoris* KM71 (Mut<sup>s</sup>). Se obtuvieron colonias transformadas seleccionadas por auxotrofia a histidina, y se verificó por PCR la integración de la secuencia en el genoma de *P. pastoris*. Además, se realizaron ensayos para detectar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las colonias obtenidas. Las etapas de la estrategia experimental para la construcción de la cepa se esquematizan en la **Figura 15**. Sin embargo, debido a que se llevaron a cabo dos transformaciones de *P. pastoris* con el vector pGAHbGalgs sin detectar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa esperada en las clonas resultantes, se realizaron caracterizaciones mediante enzimas de restricción y PCR, las cuales se describen en los apartados posteriores.



**Figura 15.** Estrategia experimental general para la obtención de la cepa de *P. pastoris* productora de  $\beta$ -galactosidasa extracelular.

#### 6.4.2. Terminología de cepas de *E. coli* y técnicas generales empleadas en la construcción del plásmido pGAHbGalgs

La construcción del plásmido pGAHbGalgs con el que se transformaría a *P. pastoris* requirió obtener los fragmentos de DNA del vector pGAH y el inserto b-Galgs de la secuencia del gen de interés, los cuales se obtuvieron a partir de plásmidos como se describe a continuación. La cepa de *E. coli* TOP10 pGAHFTEII, construida previamente en el grupo de trabajo (Herrera-Estala 2015), se empleó para obtener el plásmido del cual se derivó el vector pGAH. Los plásmidos de los cuales se derivó la secuencia sintética codificante para  $\beta$ -galactosidasa de *P. aeruginosa* (inserto b-Galgs) se obtuvieron de las cepas de *E. coli* EPI300 pCC1-b-Galgs (enviada por GenScript), *E. coli* TOP10 pCC1-b-GalgsE (transformada con el plásmido extraído de *E. coli* EPI300 pCC1-b-Galgs, por lo que se le añadió el sufijo “E”) y *E. coli* TOP10 pCC1-b-GalgsL (transformada con el plásmido liofilizado enviado por GenScript, por lo que se le añadió el sufijo “L”).

Los métodos de aislamiento de DNA plasmídico de cepas de *E. coli* se basaron en el fundamento de lisis alcalina, la cual se realizó a pequeña escala para la caracterización de los plásmidos por análisis mediante corte con enzimas de restricción; y a mediana escala para la obtención de DNA para digestiones a escala preparativa. La extracción a

pequeña escala, la cual se denominará como miniprep (6.4.2.1), generalmente se realizó con las células obtenidas a partir de un volumen de 4 mL de cultivo. La extracción a mediana escala, la cual se denominará como midiprep (6.4.2.4), generalmente se realizó con las células obtenidas de volúmenes superiores o iguales a 40 mL de cultivo. En algunos casos en los que se realizaría caracterización de los plásmidos mediante análisis con enzimas de restricción, los plásmidos se aislaron empleando uno de los siguientes kits (especificados en el apartado correspondiente): Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Cat. A1330) (6.4.2.2) o PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Cat. A1222) (6.4.2.3).

Algunas preparaciones de DNA, especialmente por midiprep, presentaron contaminación con RNA y proteínas. En estos casos, las preparaciones de DNA se incubaron con RNasa de la forma en la que se describe en el apartado metodológico correspondiente. Después del tratamiento con RNasa, se realizaron pasos adicionales de purificación de DNA para los midipreps, entre los que se incluye el tratamiento con solventes orgánicos (6.4.2.5), referido como “reextracción” con el fin de remover proteínas contaminantes. Para algunas preparaciones, también se llevó a cabo una purificación con columnas de sílice, para lo que se utilizó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. A9281) (6.4.2.6), o con cartuchos de concentración y desalado (6.4.2.7)

La extracción de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa se llevó a cabo con dos métodos, los cuales requieren de una electroforesis previa con tratamiento para disminuir la posibilidad de degradación con nucleasas (6.4.2.8). El primero de éstos, en el que se centrifugó la agarosa con un filtro de algodón (6.4.2.9), se describe en apartados posteriores, pero fue descartado debido a su baja recuperación y porque el DNA recuperado con este método no pudo ser ligado. El segundo, se realizó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. A9281) (6.4.2.10).

A menos que se indique lo contrario, la concentración de las preparaciones de DNA se realizó en un equipo de concentración por centrifugación y evaporación por vacío (CentriVap). Alternativamente, se intentó la concentración mediante la evaporación en bloque de calentamiento, pero el método se descartó tras ocasionar degradación del DNA.

El análisis de la calidad del DNA obtenido se llevó a cabo empleando la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % con pre-tinción con GelRed, para la cual se emplea el término electroforesis, a menos que se indique una concentración de agarosa o un método de tinción distinto. La estimación de la concentración de DNA se realizó por espectrofotometría a 260 nm utilizando un nano-espectrofotómetro (Implen), análisis que se designará como análisis con nano-espectrofotómetro o nano-espectrofotometría.

La transformación de las cepas con los plásmidos construidos presentó variantes que se mencionan en el correspondiente apartado, por lo que no se incluye la transformación entre las técnicas generales. El protocolo de preparación de células competentes de *E. coli* (6.4.2.11), así como de la conservación de las cepas transformadas (6.4.2.13) se incluyen en este apartado.

#### **6.4.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep) por el método de lisis alcalina**

El paquete celular proveniente de 4 mL de cultivo se recolectó mediante dos centrifugaciones sucesivas por 5 min a 8000 rpm a 4 °C en tubos de 2 mL nuevos y estériles, decantando el medio de cultivo tras cada centrifugación. Al paquete celular se añadieron 200 µL de Solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM) y se resuspendieron las células por completo. Una vez resuspendido el paquete celular, se agregaron 400 µL de Solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1 %) recién preparada y se mezcló por inversión de 3 a 6 veces hasta observar un cambio en la viscosidad de la muestra. La mezcla se incubó por 5 min en hielo, tras los cuales se le agregaron 300 µL de Solución III (acetato de amonio 7.5 M, pH 7.8), se mezcló por inversión, se incubó en hielo por 5 min y luego se centrifugó por 10 min a 14000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 2 mL nuevo y estéril, se agregaron 650 de isopropanol absoluto y se centrifugó por 15 min a 14000 rpm y 4 °C. El sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó añadiendo 500 µL de etanol al 70 % y centrifugando por 5 min a 14000 rpm y 4 °C. El sobrenadante se decantó y la pastilla de DNA se secó invirtiendo el tubo sobre papel secante por 15 min para eliminar los restos de etanol de la pastilla. Se agregaron 50 µL de buffer TE 1X (o un volumen acorde a la cantidad de DNA plasmídico obtenido) y se calentó la muestra de

DNA plasmídico a 65 °C por 15 min para inactivar nucleasas. La muestra se almacenó a 4 °C para su uso a corto plazo, o a -20 °C para su conservación a largo plazo.

#### **6.4.2.2. Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep) con el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System**

Las preparaciones de DNA plasmídico obtenidas con el uso del kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Cat. A1330) se generaron de la manera que se describe a continuación. A partir del cultivo de la cepa de *E. coli*, se obtuvieron paquetes celulares a partir de 4 mL de cultivo, mediante dos centrifugaciones por 7 min y 6000 rpm en tubos de 2 mL nuevos y estériles. Los paquetes celulares se resuspendieron por completo con 250 µL de solución de resuspensión de células (*Cell Resuspension Solution*), se añadieron 250 µL de solución de lisis celular (*Cell Lysis Solution*) a cada muestra y se mezcló por inversión 4 veces. A continuación, se añadieron 4 µL de solución de proteasa alcalina (*Alkaline Protease Solution*), se mezcló por inversión 4 veces y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se añadieron 350 µL de solución de neutralización (*Neutralization Solution*), se mezcló por inversión 4 veces y se centrifugó por 10 min a 14000 rpm a temperatura ambiente.

El sobrenadante obtenido en la centrifugación anterior se vertió en la columna del kit previamente ensamblada en el tubo colector, y se centrifugó por 1 minuto a 14000 rpm a temperatura ambiente. Se descartó el filtrado y se reensambló la columna. A continuación, se añadieron a la columna 750 µL de solución de lavado (*Wash Solution*) conteniendo etanol de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sistema se centrifugó por 1 min a 14000 rpm, se descartó el filtrado del tubo colector y se reensambló la columna, luego se añadieron 250 µL de solución de lavado, se centrifugó por 1 min a 14000 rpm, se descartó el filtrado y se reensambló la columna. Se volvió a centrifugar por 2 min a 14000 rpm.

La columna se transfirió a un tubo nuevo y estéril de 2 mL, se añadieron 100 µL de agua libre de nucleasas, previamente calentada a 65 °C, y se centrifugó por 1 minuto a 14000 rpm. La solución eluida de DNA se analizó por electroforesis y se almacenó a 4 °C o a -20 °C para su uso a largo plazo.

#### **6.4.2.3. Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep) con el kit PureYield Plasmid Miniprep System**

Se obtuvo el paquete celular a partir de 4 mL de cultivo por centrifugaciones sucesivas de 7 min a 8000 rpm, y el paquete celular resultante se resuspendió en 600  $\mu$ L de agua bidestilada estéril. Se añadieron 100  $\mu$ L de buffer de lisis (*Cell Lysis Buffer*) a la suspensión celular y se mezcló el tubo por inversión. Se añadieron 350  $\mu$ L de solución de neutralización (*Neutralization Solution*) y se mezcló por inversión. Se centrifugó por 3 min a 12000 rpm, y el sobrenadante se transfirió a una minicolumna PureYield, sin transferir restos del pellet. Se colocó la minicolumna en un tubo colector y se centrifugó por 15 s a 12000 rpm, tras lo cual se descartó el sobrenadante y se colocó la minicolumna en el mismo tubo colector. Se añadieron 200  $\mu$ L de solución de lavado de endotoxina (*Endotoxin Removal Wash*) a la minicolumna y se centrifugó por 15 s a 12000 rpm. Posteriormente, se añadieron 400  $\mu$ L de solución de lavado de columna (*Column Wash Solution*) a la minicolumna y se centrifugó por 30 s a 12000 rpm. Se transfirió la minicolumna a un tubo de 2 mL nuevo y estéril y se añadieron 30  $\mu$ L de buffer de elución (*Elution Buffer*) directamente a la matriz y se incubó 1 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 30 s para eluir el DNA plasmídico y se calentó a 65 °C por 15 min para inactivar nucleasas.

#### **6.4.2.4. Aislamiento de DNA plasmídico a mediana escala (midiprep) por el método de lisis alcalina**

Se partió de un cultivo de al menos 40 mL de la cepa de *E. coli* transformada con el plásmido de interés. Para esto, se inoculó 1 mL de conserva o cultivo de *E. coli* por cada 40 mL de medio. La cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pGAHFTEII (y posteriormente las cepas transformadas con el vector derivado de este plásmido) se cultivó en medio LB con ampicilina 100  $\mu$ g/mL. La cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pCC1-b-Galgs se cultivó en medio LB con cloranfenicol 25  $\mu$ g/mL. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C (a menos que se indique específicamente otra temperatura) y 250 rpm por aproximadamente 16 h. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se colectaron transfiriendo el cultivo a tubos de 50 mL en condiciones de esterilidad, los cuales se centrifugaron 15 min a 6000 rpm y 4 °C. Se descartó el medio (a menos que se considerara que podía aumentar la turbidez del cultivo, en cuyo caso se devolvía el medio



libre de células al matraz en condiciones de esterilidad) y se procedió a usar el paquete celular obtenido para la extracción de DNA plasmídico a mediana escala. Se añadieron 2 mL de Solución I al paquete celular y se resuspendieron completamente las células con la puntilla de la micropipeta, evitando dejar agregados celulares antes de proceder al siguiente paso. Posteriormente, se añadieron 4.5 mL de Solución II (SDS 1 %, NaOH 0.2 M) recién preparada a las células y se mezcló cuidadosamente por inversión el contenido del tubo hasta que la solución cambió su viscosidad. Inmediatamente se agregaron 2.7 mL de acetato de sodio 3 M y se mezcló por inversión cuidadosamente hasta observar una pérdida de viscosidad y formación de “hojuelas” de restos celulares. Se centrifugó por 20 min a 4000 rpm a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 50 mL nuevo. Al sobrenadante se le añadió un volumen de isopropanol (~9 mL), se mezcló por inversión y se centrifugó por 20 min a 4000 rpm a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla resultante con 5 mL de etanol al 70 %. Tras el paso anterior, la pastilla se centrifugó 5 min a 4000 rpm y 4 °C, se descartó el sobrenadante y se invirtió el tubo sobre papel secante para la evaporación de los restos de etanol. La pastilla resultante de la preparación se resuspendió en 200 a 300 µL de TE 1X según su tamaño, y se transfirió a un tubo de 2 mL nuevo y estéril. La concentración de la preparación de DNA se determinó con nano-espectrofotómetro y se analizó su calidad por electroforesis. La muestra se calentó a 65 °C por 20 min para inactivar nucleasas. Las preparaciones con presencia de RNA en los geles de electroforesis se trataron con 0.5 µL de RNasa ONE 10 U/µL (Promega), a 37 °C por ~16 h.

#### **6.4.2.5. Purificación del DNA plasmídico mediante solventes orgánicos**

A la muestra de DNA tratada con RNasa, que normalmente presentaba un volumen de 200-300 µL, se le agregó un volumen de fenol saturado y un volumen de SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó por 7 min a 14000 rpm y 4 °C. La fase acuosa del sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y estéril de 2 mL, a la cual se añadieron 0.1 volúmenes de Solución III y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó incubando 1 h a -20 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 7 min a 14000 rpm y 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol

al 70 %. Se centrifugó 5 min a 14000 rpm y 4 °C y se resuspendió en 100-150 µL de TE 1X, según el tamaño de la pastilla de DNA obtenida.

#### **6.4.2.6. Purificación del DNA plasmídico con columnas de sílice**

Para la purificación posterior de la muestra de DNA plasmídico se empleó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. A9281). Se añadió un volumen de solución de unión a membrana (*Membrane Binding Solution*) a la muestra de DNA plasmídico. Se ensambló una minicolumna (SV Minicolumn) del kit en un tubo colector, se transfirió la muestra de DNA con solución de unión a membrana a la minicolumna ensamblada y se incubó 1 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14000 rpm por 1 min, se descartó el eluido del tubo colector y se volvió a ensamblar. Se añadieron 700 µL de solución de lavado de membrana (*Membrane Wash Solution*), se centrifugó por 1 min a 14000 rpm, se descartó el eluido del tubo colector y se volvió a ensamblar. Se añadieron 500 µL de solución de lavado de membrana, se centrifugó por 5 min a 14000 rpm, se descartó el eluido del tubo colector y se volvió a ensamblar. Se vació el tubo colector y se centrifugó la columna ensamblada a 14000 rpm por un minuto para eliminar restos de etanol. Se transfirió la minicolumna a un tubo nuevo de 2 mL y se le añadieron 50 µL de agua libre de nucleasas calentada a 65 °C, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó por 1 min a 14000 rpm. El proceso se repitió añadiendo otros 50 µL de agua libre de nucleasas calentada a 65 °C, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó por 1 min a 14000 rpm, resultando en un volumen total de elución de 100 µL.

#### **6.4.2.7. Purificación del DNA plasmídico por filtración**

Las preparaciones de DNA se concentraron y desalaron con los cartuchos Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (Millipore). Cada preparación se colocó en un cartucho adaptado a un tubo de nuevo de 2 mL, al cual se le añadieron 400 µL de agua estéril libre de nucleasas, se centrifugó por 10 min a 14000 rpm a 4 °C y se descartó el filtrado del tubo colector. Se hicieron 4 lavados en total de esta misma manera, en el último de los cuales las preparaciones se centrifugaron por 20 min a 14000 rpm y 4 °C. Finalmente, se recuperó el DNA invirtiendo el cartucho en un tubo nuevo de 2 mL, se

centrifugó 3 min a 3000 rpm a 4 °C, y el DNA obtenido se calentó a 65 °C por 20 min para inactivar nucleasas.

#### **6.4.2.8. Electroforesis en geles de agarosa tratados para disminuir la degradación del DNA**

Para obtener los fragmentos de DNA del vector y del inserto, se llevaron a cabo reacciones de corte con enzimas de restricción a escala preparativa, que posteriormente se sometieron a electroforesis para separar los fragmentos y purificarlos a partir del gel. Para minimizar la posibilidad de degradación del DNA en el proceso, la electroforesis se llevó a cabo de la forma que a continuación se describe.

La cámara de electroforesis se llenó con SDS al 0.1 %, y se sumergieron los aditamentos para la preparación del gel (molde, empaques del molde y peine con cuatro carriles) en la cámara por 1 h. Transcurrido el tiempo, se vació la cámara, y ésta y los aditamentos se enjuagaron con agua bidestilada tres veces y una última vez con H<sub>2</sub>O Milli-Q.

En un matraz estéril, se depositaron 0.4 g de agarosa y se le añadieron 50 mL de TBE 1X estéril. La agarosa se fundió en horno de microondas, se vació en el molde ensamblado con el peine y se esperó a que solidificara, tras lo cual se retiraron los empaques y el peine del gel. El gel se colocó junto con el molde en la cámara de electroforesis, la cual se llenó con buffer TBE 1X nuevo y estéril.

La reacción de restricción a escala preparativa se preparó para su carga en el gel mezclando 50 µL de ésta con 10 µL de Green Buffer 5X (Promega) y 5 µL de GelRed utilizado para la pre-tinción de la electroforesis. Esta mezcla se distribuyó en los carriles del gel. La cámara de electroforesis se cerró, se conectaron los electrodos, se establecieron los parámetros en la fuente de poder a 100 V, 84 mA y ~1 h (el tiempo varió según la migración de la muestra) y comenzó el proceso de electroforesis.

Para el corte de la banda con DNA después de la electroforesis, el gel (sobre el molde) se colocó en el transiluminador previamente limpiado con etanol y SDS 0.1 %, junto con el molde para protegerlo de la exposición excesiva a la luz UV. Se encendió el transiluminador seleccionando la luz UV de menor intensidad o mayor longitud de onda.

Se empujó el gel fuera del molde lo mínimo posible para determinar la posición de las bandas y se hicieron incisiones con una navaja de bisturí nueva y estéril marcando la banda a purificar. El transiluminador se apagó y se terminó el corte de las bandas, de las cuales se extrajo DNA ya fuera por centrifugación con filtro de algodón (6.4.2.9) o con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. A9281) (6.4.2.10).

#### **6.4.2.9. Purificación de DNA a partir de bandas de electroforesis en gel de agarosa mediante centrifugación con filtro de algodón**

Para la purificación de DNA a partir de bandas de electroforesis en gel de agarosa mediante centrifugación con filtro de algodón, primero se realizó una electroforesis disminuida en nucleasas como se describió previamente (6.4.2.8).

El montaje de los tubos en donde se colocarían las bandas de agarosa a purificar se llevó a cabo de la forma descrita a continuación. A un tubo de 0.6 mL nuevo y estéril se le realizó una pequeña perforación en el fondo utilizando una aguja calentada en mechero. El tubo perforado se rellenó con algodón esterilizado hasta un volumen de 0.2 mL usando guantes. Se perforaron y rellenaron tantos tubos como el número de muestras a purificar.

Se cortaron las bandas que se buscaban purificar con una navaja de bisturí nueva y estéril, y se colocó cada banda en un tubo con algodón perforado. Los tubos se cerraron, se colocaron dentro de tubos de 2 mL nuevos como soporte y se mantuvieron a -20 °C por al menos 40 min. Luego, los tubos se centrifugaron por 15 min a 14000 rpm y 4 °C, recuperando aproximadamente 200 µL de líquido. Al líquido recuperado se le agregaron 0.1 volúmenes (20 µL) de acetato de sodio 3 M y 3 volúmenes (600 µL) de etanol absoluto. La solución resultante se mezcló con vórtex por 2 s y se centrifugó por 20 min a 14000 rpm y 4 °C. El sobrenadante se descartó, se lavó la pastilla con 0.5 mL de etanol al 70 % y se centrifugó por 5 min a 14000 rpm y 4 °C. El sobrenadante se descartó, y el tubo se dejó secando sobre papel para eliminar restos de etanol. Una vez seca, la pastilla se resuspendió en 30 µL de TE 1X. Se analizó la calidad del DNA purificado mediante electroforesis.

#### **6.4.2.10. Purificación de DNA a partir de bandas de electroforesis en gel de agarosa mediante unión a columnas de sílice**

Para la purificación de DNA a partir de bandas de electroforesis en gel de agarosa mediante unión a columnas de sílice, primero se realizó una electroforesis disminuida en nucleasas como se describió previamente (6.4.2.8).

Antes de realizar el corte de las bandas, se pesaron tubos de 2 mL nuevos y estériles y se registró su peso. Cada una de las bandas cortadas se colocó en uno de estos tubos. Se pesó de nuevo el tubo con la banda de agarosa y se restó a este valor el peso del tubo sin agarosa para obtener el peso de la banda de agarosa cortada.

Para la purificación del DNA a partir de la banda del gel de agarosa se empleó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. A9281). Al tubo que contenía el fragmento del gel se le añadió 1  $\mu$ L de solución de unión a membrana (*Membrane Binding Solution*) por mg de agarosa y se incubó a 50 °C, mezclando por inversión cada 30 s, hasta la disolución completa del fragmento del gel. Una minicolumna (SV Minicolumn) del kit se ensambló en un tubo colector, se transfirió la muestra de DNA con solución de unión a membrana a la minicolumna ensamblada y se incubó 1 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó por 1 min a 14000 rpm, se descartó el filtrado del tubo colector y se volvió a ensamblar el sistema. Posteriormente, se añadieron 700  $\mu$ L de solución de lavado de membrana (*Membrane Wash Solution*), se centrifugó por 1 min a 14000 rpm, se descartó el filtrado del tubo colector y se volvió a ensamblar el sistema. Se continuó con la adición de 500  $\mu$ L de solución de lavado de membrana, se centrifugó por 5 min a 14000 rpm, se descartó el filtrado del tubo colector y se volvió a ensamblar. Se centrifugó la columna ensamblada por 1 min a 14000 rpm para eliminar restos de etanol. La minicolumna se transfirió a un tubo nuevo de 2 mL y se le añadieron 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas calentada a 65 °C, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó por 1 min a 14000 rpm. El tubo con el filtrado se rotuló y se almacenó a 4 °C para su uso a corto plazo o a -20 °C para su conservación a largo plazo. Antes de su almacenamiento, se analizó la calidad del DNA purificado mediante electroforesis.

#### **6.4.2.11. Preparación de células de *E. coli* TOP10 calciocompetentes**

A partir de una conserva de células de *E. coli* TOP10 sin transformar, se sembró una asada por estría en una placa de agar LB, la cual se incubó a 37 °C. Una de las colonias que crecieron en la placa se inoculó en 4 mL de medio LB contenidos en un tubo de 15 mL estéril y se incubó a 37 °C y 250 rpm por ~16 h. Una vez crecido el cultivo, se inocularon 2 mL de éste en 80 mL de medio LB contenidos en un matraz estéril de 250 mL. La  $DO_{600\text{ nm}}$  inicial resultante de este cultivo fue de aproximadamente 0.05. El cultivo se incubó a 37 °C y 250 rpm, y se detuvo cuando alcanzó una  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0.46 (~3 h). Las células del cultivo se colectaron en dos tubos estériles de 50 mL, se incubaron en hielo por 5 min, se centrifugaron por 10 min a 4500 rpm y 4 °C en una centrífuga pre-enfriada y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en un volumen total de 8 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M previamente enfriado en hielo y se incubaron por 10 min en hielo, tras lo cual se centrifugaron por 10 min a 4500 rpm y 4 °C en una centrífuga pre-enfriada. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en un volumen total de 4 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M enfriado en hielo. Las células se incubaron en hielo dentro de un refrigerador a 4 °C por ~16 h y posteriormente se distribuyeron en alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  en tubos de 0.6 mL nuevos y estériles, y se almacenaron a -20 °C para su uso dentro de una semana, o se añadió glicerol absoluto estéril a una concentración final de 20 % para su conservación a largo plazo a -70 °C.

#### **6.4.2.12. Transformación de *E. coli* TOP10**

Para la transformación, se emplearon células de *E. coli* TOP10 calciocompetentes preparadas según el protocolo del apartado **6.4.2.11** y almacenadas a -20 °C. Una alícuota de células calciocompetentes se distribuyó en 2 alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  en tubos estériles de 2 mL. A una de las alícuotas se le agregó el volumen de DNA que se describe en los apartados correspondientes, a la otra no se le agregó DNA y se empleó como control. Ambas alícuotas se incubaron en hielo ~30 min, tras los cuales se les aplicó un choque térmico a 42 °C por 30 s en bloque de calentamiento (Thermomixer R, Eppendorf) para luego incubarse inmediatamente en hielo por 2 min. A cada alícuota se le agregó 1 mL de medio SOC y se incubaron a 37 °C por 1 h. Finalizada la incubación, se centrifugó el tubo que contenía las células transformadas con DNA por 6 min a 6000 rpm y 24 °C, se decantó

el sobrenadante en condiciones de esterilidad, y las células se resuspendieron en el medio que no se pudo decantar usando una micropipeta de 20-200  $\mu\text{L}$  con una puntilla estéril. La totalidad de las células resuspendidas se transfirió a una placa de agar LB con el antibiótico correspondiente al marcador de selección y se extendieron en la placa en condiciones de esterilidad con un asa bacteriológica de metal esterilizada sumergiéndola en alcohol y pasándola por el mechero. También se sembraron dos controles usando la alícuota de células competentes a la que no se le agregó DNA: se inocularon 100  $\mu\text{L}$  de las células en una placa de agar LB, como control de viabilidad, y se inocularon 500  $\mu\text{L}$  en una placa de agar LB con el antibiótico correspondiente como control de la susceptibilidad de las células al antibiótico. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h, a menos que se indique lo contrario.

#### **6.4.2.13. Conservación de cepas de *E. coli***

Las cepas de *E. coli* a conservar se cultivaron en 4 mL de LB con el antibiótico correspondiente al marcador de selección contenidos en un tubo de 15 mL estéril. Una vez crecido el cultivo, se añadieron al tubo 4 mL de glicerol absoluto estéril, para obtener una concentración de glicerol de 50 % en las conservas. El cultivo con glicerol se mezcló hasta uniformizarse por completo y se distribuyó en tubos de 2 mL estériles, los cuales se almacenaron a -20 °C para su conservación.

#### **6.4.3. Obtención de la secuencia sintética de la $\beta$ -galactosidasa extracelular a producir en *P. pastoris***

##### **6.4.3.1. Elección de la secuencia de la $\beta$ -galactosidasa extracelular a producir en *P. pastoris***

Se realizó una búsqueda en la literatura de  $\beta$ -galactosidasas que se hubieran expresado previamente en *P. pastoris*. Se buscó que la enzima fuera extracelular y monomérica, que perteneciera a un organismo taxonómicamente cercano a *P. pastoris* (preferiblemente un hongo) y que fuera similar a  $\beta$ -galactosidasas con expresión reportada en *P. pastoris* con anterioridad. Para esto, se buscaron secuencias de  $\beta$ -galactosidasas en bases de datos de enzimas (BRENDA, <https://www.brenda-enzymes.org/>) (Placzek et al. 2017) y se obtuvieron sus parámetros de actividad, especialmente los rangos de

temperatura y pH a los cuales presentan actividad. También se buscaron reportes de  $\beta$ -galactosidasas producidas previamente en *P. pastoris* y se obtuvieron sus parámetros de actividad reportados (resumidos previamente en la sección 2.1.3.2). La enzima seleccionada fue la de *P. aeruginosa* por presentar los criterios mencionados anteriormente en este apartado, y tener el más alto rendimiento reportado para la producción de  $\beta$ -galactosidasa en un cultivo de alta densidad de *P. pastoris* (22 mg/mL con actividad de 9500 U/mL) y una actividad específica reportada relativamente alta (820 U/mg purificada) (Katrolia et al. 2011).

#### **6.4.3.2. Diseño de la secuencia sintética de la $\beta$ -galactosidasa extracelular a producir en *P. pastoris***

La secuencia nucleotídica de la  $\beta$ -galactosidasa de *P. aeruginosa* se obtuvo a partir del identificador de la secuencia reportado en la publicación en la que se describe su expresión en *P. pastoris* (Katrolia et al. 2011). A partir de la secuencia nucleotídica, se obtuvo su secuencia aminoacídica, la cual resultó idéntica a la ya reportada en las bases de datos de GenBank y UniProt (accesos ADW66246.1 y G8ZAH2, respectivamente).

A la secuencia aminoacídica se le eliminó la región del péptido señal, indicado en la publicación y las bases de datos, y a continuación se le realizó una transcripción reversa con optimización de codones para *P. pastoris* usando el programa BioEdit (Hall 1999) y una tabla de codones preferenciales de *P. pastoris* creada a partir de los genes de su genoma completo (De Schutter et al. 2009). En la secuencia nucleotídica obtenida se modificaron los sitios con 6 A o T para eliminar posibles sitios de terminación temprana de la traducción, sustituyendo un codón por el segundo codón preferencial. Se usó la herramienta DNA Pattern Find ([http://www.bioinformatics.org/sms2/dna\\_pattern.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/dna_pattern.html)) para obtener un listado de todos los sitios con 6 A o T en la secuencia con codones preferenciales obtenida. Se encontraron 224 de estos sitios, traslapándose algunos de estos, por lo que en total se encontraron 75 regiones de al menos 6 A o T, algunas de las cuales necesitaban más de una sustitución para eliminar dichas regiones por completo. Mediante un análisis de los sitios en Microsoft Excel y la generación de un script para sustituir bases en posiciones específicas, se realizaron 89 sustituciones a la secuencia para interrumpir todos los sitios de al menos 6 A o T.



A la secuencia resultante se le añadieron sitios de restricción al inicio y al final: un sitio de restricción para XhoI (CTCGAG) en el extremo 5' y uno para NotI (GCGGCCGC) en el 3'. Se añadieron además codones para Lys y Arg (AAAAGA) como señal de reconocimiento para la proteasa Kex2 entre el sitio de XhoI y la secuencia sintética, y un codón de término (TAA) entre el final de la secuencia y el sitio NotI. La secuencia sintética resultante, con los sitios de restricción y codones añadidos, presentó un tamaño total de 3002 pb.

Se comprobó que la secuencia no contuviera sitios de restricción adicionales de XhoI, NotI o SalI que pudiesen interferir con la clonación, empleando el programa NebCutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) (Vincze et al. 2003).

La secuencia final se envió a la compañía GenScript para su síntesis. Debido a que la secuencia sintética se envía clonada en un vector, al momento de elegirlo se buscó que éste fuera de un tamaño significativamente distinto al de la secuencia sintética (3002 pb) para obtener una resolución en el gel de electroforesis que permitiera separar las bandas al momento de purificar el inserto b-Galgs. Debido a que mayoría de los vectores disponibles tenían un tamaño cercano al del gen (~2700 pb), se optó por elegir el vector pUC57-mini por presentar el tamaño más pequeño entre los vectores disponibles (1835 pb). La clonación en este vector generaría dos bandas suficientemente separadas para el aislamiento de la secuencia sintética. Sin embargo, se debe mencionar que la síntesis de la secuencia por la compañía tardó más del tiempo esperado, y que, en vez de ser clonada en el vector pUC57-mini, fue clonada en el vector pCC1 sin mencionar una razón en específico para el cambio. Como se estuvo de acuerdo con el cambio de vector, se procedió con la entrega de la secuencia sintética.

#### **6.4.3.3. Manejo y conservación en cepas de *E. coli* de la secuencia sintética codificante para $\beta$ -galactosidasa de *P. aeruginosa***

Se recibió el plásmido que contenía la secuencia del gen sintético, el cual se designará como el plásmido pCC1-b-Galgs de ahora en adelante. Este plásmido se envió en dos formatos: 1) como 4  $\mu$ g de plásmido liofilizado o 2) como *bac-stab*, un vial de agar picado con la cepa de *E. coli* EPI300 transformada con pCC1-b-Galgs. A su llegada, el plásmido liofilizado se almacenó a -20 °C y el *bac-stab* se almacenó a 4 °C.

Se decidió trabajar con la cepa de *E. coli* EPI300 ya transformada para obtener el plásmido pCC1-b-Galgs, y reservar el plásmido liofilizado. Se siguieron las instrucciones enviadas por GenScript para el cultivo y el manejo de la cepa, descritas a continuación. Se añadieron 500  $\mu$ L de medio LB sin antibiótico al *bac-stab* de *E. coli* EPI300 pCC1-b-Galgs y se incubó a 37 °C sin agitación por 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 10  $\mu$ L del cultivo y se transfirieron a una placa de agar LB adicionado con cloranfenicol 25  $\mu$ g/mL para realizar una extensión en placa, la cual se incubó a 37 °C por ~16 h. Una vez crecidas las colonias de *E. coli* EPI300 pCC1-b-Galgs en la placa, se levantó una de éstas y se inoculó en 4 mL de medio LB con cloranfenicol 25  $\mu$ g/mL contenidos en un tubo de 15 mL estéril. Este cultivo se incubó a 30 °C con agitación a 250 rpm. No se incubó a 37 °C por la logística de las incubadoras y porque el cambio de temperatura sólo afectaría con un crecimiento más lento de la cepa.

Tras crecer en el medio, la cepa se cultivó para su conserva como se indica en el apartado **6.4.2.13**, y el resto del cultivo se empleó para extraer DNA plasmídico por el protocolo de lisis alcalina (**6.4.2.1**). Con la muestra de plásmido obtenida, se llevó a cabo la transformación (de forma similar a la descrita en el apartado **6.4.2.12**) de 100  $\mu$ L de células calciocompetentes (**6.4.2.11**) de la cepa de *E. coli* TOP10 empleando 2  $\mu$ L de la preparación del plásmido pCC1-b-Galgs obtenida, y tras el choque térmico a 42 °C por 30 s se le añadió 1 mL de medio SOC y se incubó a 37 °C. Luego se extendieron 100  $\mu$ L de una dilución 1:10 de la transformación en placa de medio LB con cloranfenicol 25  $\mu$ g/mL y se incubó a 37 °C. De esta transformación se obtuvieron alrededor de 100 colonias, de las cuales se inoculó una en 4 mL de medio LB con cloranfenicol 25  $\mu$ g/mL en un tubo de 15 mL estéril. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación a 250 rpm. Una vez crecido, el cultivo de *E. coli* TOP10 pCC1-b-GalgsE se conservó como se indica en el apartado **6.4.2.13**.

#### **6.4.4. Primera construcción del plásmido pGAHbGalgs**

Se realizaron tres intentos de construcción del plásmido pGAHbGalgs. En la primera y segunda construcciones se llegó a la transformación de *P. pastoris* con el plásmido construido, sin embargo, las cepas generadas no presentaron actividad de  $\beta$ -galactosidasa, en la tercera construcción se detuvo el proceso al comprobar que el vector

construido presentó alteraciones después de su propagación en *E. coli*. A continuación, se presenta la metodología empleada para la construcción de los vectores.

#### **6.4.4.1. Aislamiento de plásmidos pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII a mediana escala**

Para obtener una cantidad de plásmido suficiente para la digestión preparativa que permitiría obtener el inserto y el vector, se requirió hacer cultivos de células para obtener DNA plasmídico a mediana escala. Para esto, se inoculó un matraz estéril de 250 mL que contenía 120 mL de medio LB adicionado con ampicilina 100  $\mu\text{g/mL}$  o con cloranfenicol 25  $\mu\text{g/mL}$  con 50  $\mu\text{L}$  de conservas de *E. coli* TOP10 pGAHFTEII (LB con ampicilina) o *E. coli* TOP10 pCC1-b-GalgsE (LB con cloranfenicol), respectivamente. Los cultivos se incubaron a 24 °C con agitación a 250 rpm por ~60 h. Una vez crecidos los cultivos, se obtuvieron dos paquetes celulares por cepa cultivada mediante centrifugación, uno generado a partir de 40 mL y otro de 80 mL. Debido a la recuperación de células relativamente baja tras la centrifugación del cultivo, el sobrenadante fue devuelto a los matraces en condiciones de esterilidad, y se incubó por dos días en las mismas condiciones, con el fin de generar una mayor cantidad de biomasa para procesar.

Se realizó el protocolo para la obtención de DNA plasmídico a mediana escala a los cuatro paquetes celulares como se indica en el apartado **6.4.2.4**, resuspendiendo las preparaciones finales en 300  $\mu\text{L}$  de buffer TE 1X y calentándolas a 65 °C por 20 min para disminuir la posible actividad de nucleasas. Se obtuvieron dos muestras por cepa cultivada. Debido a la posible presencia de RNA, que podría afectar la reacción de digestión, se les agregó 0.5  $\mu\text{L}$  de RNase ONE 10 U/ $\mu\text{L}$  (Promega) a las cuatro muestras, las cuales se incubaron por 2 h a 37 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para verificar la calidad de las muestras. Debido a la presencia de RNA en las muestras, las muestras con RNasa se dejaron incubando por ~20 h adicionales. Posteriormente, las muestras marcadas como “2” de cada plásmido se reextrajeron con solventes orgánicos, como se describe en el apartado **6.4.2.5**, y se resuspendieron en 150  $\mu\text{L}$  de TE 1X. Se comprobó la calidad de las preparaciones por electroforesis, detectando contaminación con RNA, por lo que se añadieron 0.5  $\mu\text{L}$  de RNase ONE 10 U/ $\mu\text{L}$  a cada una de las 4 muestras y se incubaron por ~16 h a 37 °C. Las preparaciones se reextrajeron con

solventes orgánicos (6.4.2.5) al día siguiente, resuspendiéndolas en 120  $\mu\text{L}$  de TE 1X, y se analizaron por electroforesis.

Se realizó un midiprep (6.4.2.4) extra por plásmido con la totalidad de las células que crecieron en el medio de cultivo incubado por dos días más (mencionado anteriormente en este mismo apartado), resuspendiendo las preparaciones finales en 300  $\mu\text{L}$  de buffer TE 1X y calentándolas a 65 °C por 20 min para disminuir la actividad de nucleasas. Se consideraron como la muestra “3” de cada plásmido. A éstas se les añadió 0.5  $\mu\text{L}$  de RNase ONE (Promega) y se incubaron por ~16 h, para posteriormente reextraer el DNA con solventes orgánicos (6.4.2.5), resuspendiendo el DNA de cada preparación en 130  $\mu\text{L}$  de TE 1X.

#### 6.4.4.2. Caracterización de los vectores pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII por análisis con enzimas de restricción I

A partir de las muestras de miniprep obtenidas en el apartado 6.4.4.1, se hizo una digestión analítica con las enzimas de restricción XhoI y NotI (New England Biolabs [NEB]), las cuales teóricamente liberan el inserto b-Galgs del plásmido pCC1-b-Galgs, y la región del vector pGAH del plásmido pGAHFTEII. Para realizar la digestión analítica, se seleccionaron las muestras “1” de pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII. Se hicieron dos digestiones analíticas por muestra de plásmido: una con las enzimas XhoI y NotI y otra sólo con la enzima XhoI como control. Se llevó a cabo la mezcla de reactivos general (coctel) para cada muestra de plásmido como se indica en la **Tabla 34**. El coctel se dividió en dos partes de 24.5  $\mu\text{L}$ . A una se le añadieron 0.25  $\mu\text{L}$  de NotI-HF 20 U/ $\mu\text{L}$  (NEB) y 0.25  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O Milli-Q, a la otra, 0.5  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Las reacciones se incubaron por 1 h a 37 °C, y posteriormente se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, usando como control las muestras de los plásmidos sin corte enzimático.

**Tabla 34.** Mezcla de reactivos para los análisis con enzimas de restricción de los plásmidos pCC1-b-Galgs y pGAHFTEII.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
DNA plasmídico*	20
H <sub>2</sub> O Milli-Q	22
Buffer CutSmart 10X (NEB)	5
XhoI 10 U/ $\mu\text{L}$ (NEB)	2
Volumen total de la mezcla de reacción	49

\*Plásmidos: muestras “1” de pCC1-b-Galgs y pGAHFTEII

#### 6.4.4.3. Reacciones de restricción a escala preparativa de los plásmidos pCC1-b-GalgsE y pGAHbGalgs con XhoI y NotI para purificación de bandas de inserto y vector (I)

Se realizó un primer intento de purificación de las bandas de inserto y vector, para lo cual se realizaron dos mezclas de reacción para digestiones preparativas, una para pCC1-b-GalgsE y otra para pGAHFTEII. La mezcla de reacción se realizó con los volúmenes de reactivos indicados en la **Tabla 35**. La reacción se incubó a 37 °C por ~16 h. Las reacciones se utilizaron para la purificación de bandas de inserto y vector, mediante una electroforesis para minimizar la degradación de DNA como se indica en el apartado 6.4.2.8. Se cargaron dos carriles del gel por plásmido para su purificación. Las bandas se purificaron por centrifugación con filtro de algodón (**6.4.2.9**) y se analizó su calidad y concentración aproximada mediante electroforesis, ya que no fue posible su cuantificación en nano-espectrofotómetro porque las lecturas no correspondían a lo observado en el gel.

**Tabla 35.** Mezcla de reacción para la digestión preparativa I con XhoI y NotI de la primera construcción.

Reactivo	Volumen (μL)
DNA plasmídico*	100
Buffer CutSmart 10X (NEB)	10
XhoI 10 U/μL (NEB)	2
NotI-HF 20 U/μL (NEB)	1
Volumen total de la reacción	113

\*Plásmidos: pCC1-b-GalgsE (muestra “1”), tratado con RNase ONE (Promega) y reextraído: 840 ng/μL; y pGAHFTEII (muestra “1”), tratado con RNase ONE (Promega) y reextraído: 2022 ng/μL.

#### 6.4.4.4. Ligación I del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la primera construcción (Fallida)

Se llevo a cabo la reacción de ligación con el inserto b-Galgs y el vector pGAH purificados con el método del filtro del algodón (**6.4.2.9**), cuya obtención se describió en el apartado (**6.4.4.3**). En la reacción de ligación, se trató de mantener una relación molar de inserto vector 3:1, empleando para el cálculo la **Ecuación 9**.

$$\text{cantidad de inserto (ng)} = \frac{\text{cantidad de vector (ng)} * \text{tamaño de inserto (kb)}}{\text{tamaño de vector (kb)}} * \text{relación molar (inserto/vector)}$$

**Ecuación 9.** Cálculo de la cantidad de inserto (ng) para la ligación.

Para una cantidad de 50 ng de vector, el cálculo indicó  $(50 * 3 / 7.5) * 3 = 60$  ng de inserto necesarios para obtener una relación molar 3:1 inserto:vector. Sin embargo, debido a que no fue posible determinar con seguridad la concentración del inserto, se empleó una mayor cantidad de ng de inserto (según la concentración estimada por electroforesis). La

ligación se realizó mezclando los volúmenes de reactivos indicados en la **Tabla 36**. Se empleó la enzima T4 DNA ligasa (Promega), con el buffer de ligación 10X incluido con la misma. La reacción se incubó por 3 h a temperatura ambiente y luego se almacenó a 4 °C por ~16 h, tras lo cual se analizó por electroforesis. Sin embargo, la ligación no se efectuó.

**Tabla 36.** Reacción de ligación I de la primera construcción

Reactivo	Volumen (μL)
Inserto b-Galgs*	25.0
Vector pGAH**	5.0
<i>Ligase Buffer</i> 10X (Promega)	3.5
T4 DNA ligasa 3 U/μL (Promega)	1.0
Volumen total de la reacción	34.5

\*Concentración aproximada: 3 ng/μL. Total en reacción: aproximadamente 75 ng.

\*\*Concentración aproximada: 10 ng/μL. Total en reacción: aproximadamente 50 ng.

#### **6.4.4.5. Reacciones de restricción a escala preparativa de los plásmidos pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII con XhoI y NotI para purificación de bandas de inserto y vector (II)**

Debido a que se había utilizado la mayor parte del inserto purificado en la ligación I, y a posibles inhibidores de la reacción de ligación en el DNA purificado con el método del filtro de algodón, se realizó nuevamente la purificación del inserto con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. A9281) (6.4.2.10). La mezcla de reacción de restricción preparativa de los plásmidos con XhoI y NotI se llevó a cabo con los volúmenes de reactivos indicados en la **Tabla 37**. Se realizó una mezcla por cada uno de los plásmidos pGAHFTEII y pCC1-b-Galgs. La reacción se incubó a 37 °C por ~16 h. Las reacciones se utilizaron para la purificación de bandas de inserto y vector mediante una electroforesis para disminuir la degradación del DNA (6.4.2.8). Se cargaron dos carriles del gel por plásmido para su purificación. La banda de inserto de uno de los carriles se purificó mediante centrifugación con filtro de algodón (6.4.2.9). La banda de inserto del carril restante y las bandas del vector de los dos carriles se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. A9281) (6.4.2.10). Se analizó su calidad y concentración aproximada mediante electroforesis, debido a que no fue posible cuantificar en nano-espectrofotómetro porque la concentración estimada por la lectura de absorbancia a 260 nm no correspondía con los resultados de la electroforesis.

Sin embargo, la recuperación del inserto b-Galgs por ambos métodos, estimada por electroforesis, no fue suficiente para proseguir con la ligación, por lo que se decidió hacer una nueva reacción de restricción preparativa para purificar solamente el inserto b-Galgs.

**Tabla 37.** Mezcla de reacción para la digestión preparativa II con XhoI y NotI de la primera construcción.

Reactivo	Volumen (μL)
DNA plasmídico*	100
Buffer CutSmart 10X (NEB)	11
XhoI 10 U/μL (NEB)	2
NotI-HF 20 U/μL (NEB)	1
Volumen total de la reacción	114

\*Plásmidos: pCC1-b-GalgsE (muestra “2”), tratado con RNase ONE (Promega) y reextraído: 1005 ng/μL, pGAHFTEII (muestra “2”), tratado con RNase ONE (Promega) y reextraído: 960 ng/μL

#### 6.4.4.6. Reacción de restricción a escala preparativa del plásmido pCC1-b-GalgsE con XhoI y NotI para purificación de bandas de inserto (III)

En la purificación anteriormente mencionada no se recuperó el inserto b-Galgs en la concentración y cantidad necesarias para hacer una ligación, por lo tanto, se llevó a cabo el proceso de purificación nuevamente. Se preparó una reacción con los volúmenes de reactivos indicados en la **Tabla 38**, la cual se incubó a 37 °C por ~16 h. Las reacciones se utilizaron para la purificación de bandas de inserto, mediante una electroforesis para disminuir la degradación del DNA (**6.4.2.8**). Se cargaron tres carriles del gel con la reacción para la purificación del inserto. Las tres bandas de inserto se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. A9281) (**6.4.2.10**). Se analizó su calidad y concentración aproximada mediante electroforesis.

**Tabla 38.** Mezcla de reacción para la digestión preparativa III con XhoI y NotI de la primera construcción.

Reactivo	Volumen (μL)
DNA plasmídico*	110
Buffer CutSmart 10X (NEB)	11
XhoI 10 U/μL (NEB)	1.5
NotI-HF 20 U/μL (NEB)	1
Volumen total de la reacción	114

\*Plásmido: pCC1-b-GalgsE (muestra “3”), tratado con RNase ONE (Promega) y reextraído.

#### 6.4.4.7. Ligación II del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la primera construcción

La reacción de ligación se llevó a cabo con el inserto b-Galgs (**6.4.4.6**) y el vector pGAH (**6.4.4.5**) purificados con el kit como se describió previamente. La ligación se

realizó mezclando los volúmenes de reactivos indicados en la **Tabla 39** y posteriormente se incubó 4 h a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se almacenó a 4 °C por ~16 h. Se analizó la reacción por electroforesis y se comprobó la ligación del inserto con el vector, por lo que se procedió a la transformación de células de *E. coli*.

**Tabla 39.** Reacción de ligación II de la primera construcción

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (μL)</b>
Inserto b-Galgs (apartado <b>6.4.4.6</b> )	15
Vector pGAH (apartado <b>6.4.4.5</b> )	2
<i>Ligase Buffer</i> 10X (Promega)	2
T4 DNA ligasa 3 U/μL (Promega)	1
Volumen total de la reacción	20

#### **6.4.4.8. Transformación de *E. coli* TOP10 calciocompetente con la primera construcción de pGAHbGalgs (reacción de ligación II)**

Para la transformación, se emplearon células de *E. coli* TOP10 calciocompetentes preparadas según el protocolo del apartado **6.4.2.11** y almacenadas a -20 °C. Las células se transformaron con la reacción de ligación II (**6.4.4.7**) empleando el protocolo del apartado **6.4.2.12**, agregando 3 μL de la reacción de ligación II a las células que se buscaba transformar. Una vez concluido el protocolo de transformación, la totalidad de las células transformadas con la ligación se sembraron por extensión en placa en agar LB con ampicilina 100 μg/mL y las placas (transformación y controles) se incubaron a 37 °C por 24 h. Las colonias resultantes (12) de la transformación se inocularon en 5 mL de medio LB con ampicilina 100 μg/mL y se incubaron a 24 °C y 250 rpm por ~60 h. A partir de 4 mL de los cultivos de las colonias transformadas se obtuvo DNA plasmídico mediante el protocolo de miniprep por lisis alcalina (**6.4.2.1**).

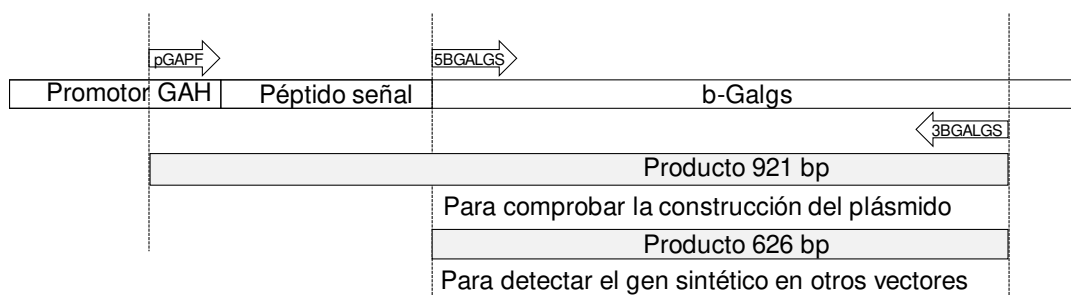
#### **6.4.4.9. Caracterización por PCR de *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido pGAHbGalgs de la primera construcción**

##### **6.4.4.9.1. Diseño de oligonucleótidos**

Para comprobar la correcta construcción del plásmido pGAHbGalgs, (derivado de la ligación del vector pGAH con el inserto b-Galgs), se diseñaron oligonucleótidos específicos para la secuencia de b-Galgs de tal forma que se pudiesen hacer dos amplificaciones de PCR distintas, las cuales se describen a continuación y se



esquematan en la **Figura 16**. En la primera, se empleó el oligonucleótido pGAPF (5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'), que hibrida en el extremo 3' del promotor GAH, y un oligonucleótido diseñado específicamente para la secuencia de b-Galgs, de forma que el producto amplificado resultara en un tamaño aproximado a 1 kb. En la segunda amplificación posible, se emplearon dos oligonucleótidos que hibridaron en la secuencia sintética codificante para  $\beta$ -galactosidasa, uno de los cuales consistente en el que ya se mencionó que se empleó en conjunto con el oligonucleótido pGAPF. El proceso del diseño de los nuevos oligonucleótidos se describe a continuación.



**Figura 16.** Esquema de amplificación y tamaño teórico de los productos de amplificación para la caracterización del plásmido pGAHbGalgs.

El diseño de los nuevos oligonucleótidos se realizó con la herramienta Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (Untergasser et al. 2012) empleando los parámetros por defecto y modificando únicamente el rango de tamaño de producto amplificado a 600-700 pb. La región de b-Galgs usada para el diseño de oligonucleótidos se ajustó para que fuera cercana al promotor y pudiera generar un producto amplificado de ~1 kb usando el primer pGAPF y el primer 3' diseñado. Una vez obtenidas las secuencias de los oligonucleótidos, se verificó que no formaran estructuras secundarias y su especificidad contra el genoma de *P. pastoris* de la forma descrita previamente (6.3.4.6.1).

El esquema de amplificación y el tamaño teórico de los productos de la reacción de PCR con el plásmido pGAHbGalgs como molde y con el oligonucleótido 5BGALGS (5'-TGCTATTTCTCATAAGTTGGATGG-3') y el oligonucleótido 3BGALGS (5'-CAGCATCTCTAGCATGATCTTCA-3'), este último utilizado en conjunto tanto con 5BGALGS como con pGAPF, se muestran en la **Figura 16**. Una vez diseñados los oligonucleótidos, se solicitó su síntesis a la compañía IDT.

#### 6.4.4.9.2. Preparación de reacciones de PCR

Para comprobar la presencia del plásmido pGAHbGalgs en las colonias transformadas, se realizaron ensayos de PCR con oligonucleótidos dirigidos a la región del promotor (pGAPF) y a una región interna del gen de  $\beta$ -galactosidasa (3BGALGS). Para realizar las PCR, se utilizaron diluciones 1:10 (1  $\mu$ L de muestra + 9  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q) de los DNA plasmídicos extraídos de las colonias 1 a 12 transformadas (6.4.4.8). Se usaron como controles de PCR: 1) una dilución 1:5 de la mezcla de ligación II (6.4.4.7), con la que teóricamente se debería obtener el producto amplificado, 2) una dilución 1:10 de muestra del plásmido pGAHFTEII, con la que teóricamente no se debería obtener producto amplificado, y 3) H<sub>2</sub>O Milli-Q como control negativo de PCR. La mezcla de reactivos para las 15 reacciones de PCR se realizó con el volumen de los reactivos mostrados en la **Tabla 40**, posteriormente se distribuyó en alícuotas de 19.2  $\mu$ L en tubos de 0.2 mL nuevos y estériles y a cada alícuota se le añadieron 0.8  $\mu$ L de la dilución de muestra o el control correspondiente. Las reacciones se introdujeron al termociclador, con el programa descrito en la **Tabla 41**. Terminado el programa, las reacciones se analizaron por electroforesis.

**Tabla 40.** Volúmenes de reactivos para PCR para caracterización de plásmido de colonias de *E. coli* TOP10 de la transformación de la primera construcción.

Reactivo	Volumen x1 ( $\mu$ L)	Volumen x15 ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	10.64	159.60
Buffer Colorless GoTaq 5X (Promega)	4.00	60.00
Oligonucleótido pGAPF (5 $\mu$ M)	2.00	30.00
Oligonucleótido 3BGALGS (5 $\mu$ M)	2.00	30.00
dNTP (Bioline) (10 mM)	0.40	6.00
GoTaq DNA Polimerasa (Promega) (5 U/ $\mu$ L)	0.16	2.40
DNA o control*	0.80	-
Volumen total de reacción	20.00	

\*Diluciones 1:10 de DNA plasmídico obtenido de colonias 1 a 12 transformadas, dilución 1:5 de reacción de ligación, dilución 1:10 de pGAHFTEII o agua Milli-Q, según se describe en el texto.

**Tabla 41.** Programa de termociclador empleado en la PCR para caracterización con oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS.

Ciclos	Temperatura (°C)	Duración (min)
1	94.0	2:00
30	94.0	0:30
	52.5	0:30
	72.0	1:30
1	72.0	10:00

#### 6.4.4.10. Obtención del plásmido pGAHbGalgs (primera construcción) linealizado para la transformación de *P. pastoris* KM71

##### 6.4.4.10.1. Aislamiento del plásmido pGAHbGalgs a mediana escala

Se inocularon dos matraces de 250 mL estériles conteniendo 100 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL, cada uno con 100 µL de cultivo de la colonia 1 de *E. coli* TOP10 pGAHbGalgs, y se incubaron a 37 °C y 200 rpm por ~24 h. Se realizaron midipreps de los cultivos como se describió previamente (6.4.2.4), obteniéndose 4 muestras (numeradas del 1 al 4), cada una resuspendida en 200 µL de TE 1X y cuya calidad se analizó por electroforesis. Se adicionaron 0.5 µL de RNase ONE 10 U/µL (Promega) a las 4 muestras de midiprep y se incubaron a 37 °C por ~20 h. Las muestras se purificaron con solventes orgánicos al día siguiente según el protocolo ya descrito (6.4.2.5), resuspendiéndolas en 100 µL de TE 1X; posteriormente se analizaron por electroforesis y se cuantificaron empleando el nano-espectrofotómetro.

##### 6.4.4.10.2. Caracterización del plásmido pGAHbGalgs por análisis con enzimas de restricción

Se realizaron dos reacciones analíticas de restricción del plásmido pGAHbGalgs extraído a mediana escala (6.4.4.10.1): una con las enzimas de restricción XhoI y NotI y la otra con la enzima Sall, para comprobar la identidad del plásmido y verificar que el corte con estas enzimas se pudiese llevar a cabo. Se empleó la preparación “1” de pGAHbGalgs de mediana escala, tratada con RNasa y reextraída. Las mezclas de reacción se realizaron como se indica en la **Tabla 42**. Las reacciones se incubaron por 90 min a 37 °C, y posteriormente se analizaron por electroforesis, usando como control la preparación del plásmido sin corte enzimático.

**Tabla 42.** Mezcla de reactivos para los análisis con enzimas de restricción del plásmido pGAHbGalgs.

Reacción Sall		Reacción XhoI y NotI	
Reactivo	Volumen (µL)	Reactivo	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	7.3	H <sub>2</sub> O Milli-Q	11.5
Buffer D 10X (Promega)	2.0	Buffer Cutsmart 10X (NEB)	2.5
BSA 10 mg/mL (100X) (Promega)	0.2	XhoI 100 U/µL (NEB)	0.5
Sall10 U/µL (Promega)	0.5	NotI 20 U/µL (NEB)	0.5
DNA plasmídico*	10.0	DNA plasmídico*	10.0
Volumen total de la reacción	20.0	Volumen total de la reacción	25.0

\*Reextracción de DNA plasmídico pGAHbGalgs a mediana escala “1” (6.4.4.10.1).

#### 6.4.4.10.3. Reacciones de restricción a escala preparativa del plásmido pGAHbGalgs

Después de verificar que el corte enzimático de pGAHbGalgs se efectuó, y debido a que las 4 muestras de DNA plasmídico obtenidas por mediana escala (6.4.4.10.1) provenían de cultivos de la misma colonia, se hizo una mezcla de las preparaciones de DNA plasmídico 1 y 2 tratadas con RNasa y reextraídas. La mezcla se empleó para preparar dos reacciones de restricción con la enzima Sall a escala preparativa, con los volúmenes de reactivos indicados en la **Tabla 43**. Las reacciones se nombraron digestión “75” y digestión “90”, según el volumen en  $\mu\text{L}$  empleado de la mezcla de plásmido. Las reacciones se incubaron a 37 °C por ~16 h.

**Tabla 43.** Mezclas para las reacciones de restricción a escala preparativa con la enzima Sall de pGAHbGalgs de la primera construcción.

Reactivo	Volumen para la dig. “75” ( $\mu\text{L}$ )	Volumen para la dig. “90” ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O Milli-Q	28.5	13.8
Buffer D 10X (Promega)	12.0	12.0
BSA 10 mg/mL (100X) (Promega)	1.2	1.2
Sall10 U/ $\mu\text{L}$ (Promega)	2.0	2.0
DNA plasmídico*	75.0	90.0
Volumen total de la reacción	118.7	119.0

\*Mezcla de las preparaciones “1” y “2” de reextracciones de DNA plasmídico pGAHbGalgs (6.4.4.10.1).

#### 6.4.4.10.4. Limpieza y concentración de las reacciones de restricción a escala preparativa del plásmido pGAHbGalgs

Para verificar el corte e integridad de pGAHbGalgs con Sall, se realizó un análisis por electroforesis de las muestras de la reacción de restricción preparativa de este plásmido (6.4.4.10.3). Una vez que se verificó el corte del plásmido y que las muestras no presentaban degradación, se determinó su concentración con un nano-espectrofotómetro. Posteriormente, se procedió a limpiar y concentrar las muestras con filtros Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (Millipore), referidos como unidades de filtración Millipore, de la forma descrita en el apartado 6.4.2.7. La calidad del DNA obtenido se analizó por electroforesis y por espectrofotometría en el nano-espectrofotómetro.

El siguiente proceso consistió en concentrar el DNA hasta obtener una concentración final de ~1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Para la concentración, cada una de las reacciones de digestión se transfirió a tubos nuevos y estériles de 0.2 mL. El tubo con la digestión “90” se colocó ligeramente destapado en el bloque de calentamiento (Thermomixer R,

Eppendorf) a 94 °C y 300 rpm por aproximadamente 1 h. El tubo con la digestión “75” se colocó en el equipo CentriVap (Labconco), limpiando previamente el interior del equipo con etanol al 70 % y SDS 0.1 %. Para emplear este equipo, se utilizó como contrapeso un tubo de 0.2 mL con el mismo volumen de agua que la muestra a concentrar, y se le realizó una marca al contrapeso indicando un volumen de 10 µL (volumen final esperado). Los tubos con la digestión y el contrapeso se colocaron destapados dentro de tubos de 0.65 mL destapados como soporte para colocarlos dentro del CentriVap. Se utilizó el programa 3 del equipo, que corresponde a una temperatura de 42 °C a 1000 rpm, y se mantuvo activo por aproximadamente 1 h hasta que el volumen llegara a la marca 10 µL. Una vez concentradas las muestras, se analizó su concentración y calidad por electroforesis y por espectrofotometría en el nano-espectrofotómetro.

#### **6.4.4.11. Transformación de *P. pastoris* KM71 con el plásmido pGAHbGalgs de la primera construcción**

##### **6.4.4.11.1. Preparación de células de *P. pastoris* KM71 electrocompetentes**

Para la preparación de las células electrocompetentes empleadas en la transformación por electroporación, se inocularon 10 mL de medio YPD con 100 µL de la cepa de *P. pastoris* KM71 en un tubo estéril de 50 mL. Este cultivo se incubó a 30 °C y 250 rpm hasta alcanzar un  $DO_{600\text{ nm}}$  de 10. Posteriormente, se inocularon 500 mL de medio YPD distribuidos en dos matraces de 1 L (250 mL de YPD en cada uno) con 2.5 mL del cultivo reactivado, de forma que el cultivo inició con una  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0.1. Ambos matraces se incubaron a 30 °C y 250 rpm hasta que la  $DO_{600\text{ nm}}$  llegó a un valor aproximado de 1.0. Después, se colectaron las células mediante centrifugaciones sucesiva por 10 min a 2000 g y 4 °C en 4 tubos estériles de 50 mL y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron los paquetes celulares en ~100 mL de medio YPD-HEPES (100 mL YPD + 2 mL HEPES 20 mM), y las células resuspendidas se traspasaron a un matraz estéril de 1 L, al cual se le añadieron 2.5 mL de DTT 1 M. Esta suspensión se incubó por 15 min a 30 °C y 250 rpm. Posteriormente, la mezcla de células y medio YPD-HEPES-DTT se aforó a 500 mL con agua destilada fría y estéril, y se obtuvieron paquetes celulares por centrifugación de la forma descrita anteriormente. Se descartó el sobrenadante, los paquetes celulares se resuspendieron en 250 mL de agua fría y estéril, y se centrifugó por 10 min a 4500 rpm y 4 °C en tubos estériles de 50 mL. A continuación, se descartó el

sobrenadante resultante, el paquete celular se resuspendió en 20 mL de sorbitol 1 M frío y estéril en un sólo tubo estéril de 50 mL, y se centrifugó por 10 min a 5000 g y 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 500 µL de sorbitol 1 M frío y estéril. Las células resuspendidas se distribuyeron en alícuotas de 40 y 100 µL en tubos estériles de 2 mL, los cuales se envolvieron en múltiples capas de papel secante, se sellaron en una caja de plástico resistente y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

#### 6.4.4.11.2. Transformación de *P. pastoris* con el vector pGAHbGalgs

Para la transformación, se emplearon dos alícuotas de 40 µL de células electrocompetentes de *P. pastoris* KM71 almacenadas a -70 °C. A una alícuota de células se le añadieron 9.5 µL, equivalentes a 9.31 µg totales, del plásmido pGAHbGalgs linealizado con SalI (digestión “75” concentrada descrita en el apartado 6.4.4.10.4, 980 ng/µL) enfriado en hielo. A la otra alícuota no se le añadió DNA, ya que serviría como control. La mezcla de células y DNA se transfirió en condiciones de esterilidad a una celda de electroporación de 2 mm nueva (Bio-Rad, Cat. 1652086), previamente enfriada en hielo por 2 min, de forma que estuviera contenida entre las placas metálicas de la celda. La celda con la mezcla de células y DNA se retiró del hielo, se le removió el exceso de humedad exterior con papel secante, y se colocó en el tren de carga del electroporador Gene Pulser® II. Electroporation System (Bio-Rad). Se ajustaron los parámetros para la electroporación en el equipo como se indica en la **Tabla 44**, y a continuación se aplicó la descarga eléctrica a las células para realizar la electroporación.

**Tabla 44.** Parámetros de electroporación empleados en la transformación de *P. pastoris* KM71 con el vector pGAHbGalgs linealizado con SalI.

Voltaje (V)	Capacitancia (µF)	Resistencia (Ω)	Campo de fuerza (kV/cm)	Longitud de pulso (mseg)
1500	25	400	7500	5

Terminada la electroporación, la celda se retiró del tren de carga, se colocó en hielo y se le añadió 1 mL de sorbitol 1 M frío y estéril en condiciones de esterilidad. La mezcla de la celda se homogeneizó por inversión. A la alícuota de células competentes a la que no se le agregó DNA también se le añadió 1 mL de sorbitol 1 M frío y estéril en condiciones de esterilidad y se homogeneizó por inversión.

Las alícuotas de células sometidas a electroporación y conteniendo el DNA, así como las alícuotas control sin DNA, se sembraron por extensión en placas de agar RDB (*Regeneration Dextrose Medium*) sin histidina para obtener las células que integraron el plásmido en las electroporadas (y como control negativo en el caso de las células sin DNA), y en placas de agar YPD, como controles de viabilidad. El medio RDB sin histidina permite seleccionar a las células que integraron el plásmido, debido a que éstas recuperan la función de la enzima histidinol deshidrogenasa y pueden sintetizar histidina, permitiéndoles crecer en medio mínimo sin este aminoácido.

Los volúmenes de células utilizados para sembrar las placas se muestran en la **Tabla 45**. Cabe destacar que las células sometidas a electroporación se sembraron en 4 placas de agar RDB sin histidina, para maximizar el número de colonias obtenidas. Las placas se incubaron a 30 °C por ~4 días tras la siembra hasta observar el crecimiento de colonias.

**Tabla 45.** Volúmenes de siembra de las células electroporadas.

Medio	Volúmenes para siembra en placa (µL)	
	Células sin DNA	Células sometidas a electroporación con pGAHbGalgs
YPD	200	50
		100
RDB	500	100
		200
		500

#### 6.4.4.12. Caracterización de cepas de *P. pastoris* pGAHbGalgs de la primera construcción por PCR directo

Se inocularon 5 colonias resultantes de la electroporación (6.4.4.11.2) en 10 mL de medio YPD contenidos en un tubo estéril de 50 mL y se incubaron a 30 °C y 250 rpm por ~24 h. Alícuotas de 0.5 mL de los cultivos se centrifugaron en tubos de 2 mL nuevos y estériles por 5 min a 14000 rpm. Los sobrenadantes se descartaron y se resuspendieron las células en 15 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril, para luego transferirse a tubos de 0.2 mL nuevos y estériles, los cuales se centrifugaron en una minicentrífuga hasta formar paquete celular y se descartó el sobrenadante. Las células se volvieron a resuspender en 15 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q, se les agregó 1 µL de liticasa 5 U/µL (liticasa de *A. luteus* L2524 [Sigma-Aldrich©]) y se incubaron 1 h a 37 °C.

Se realizó la caracterización por PCR de las cepas para comprobar la integración del vector pGAHbGalgs, empleando los oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS. Se preparó una mezcla de reacción para 7 reacciones, con los volúmenes de reactivos que se indican en la **Tabla 46**. La mezcla se dividió en alícuotas de 24  $\mu\text{L}$  en tubos de 0.2 mL nuevos y estériles. A cinco alícuotas se les agregó 1  $\mu\text{L}$  de células tratadas con liticasa de la clona (1 a 5) correspondiente. Se empleó como control positivo una dilución 1:10 de la ligación II de la primera construcción (1  $\mu\text{L}$  de ligación + 9  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O Milli-Q) (**6.4.4.7**) y como control negativo, 1  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Se usó el programa del termociclador descrito en la **Tabla 41**.

**Tabla 46.** Volúmenes de reactivos para PCR para caracterización de clonas de *P. pastoris* KM71 pGAHbGalgs

Reactivo	Volumen x1 ( $\mu\text{L}$ )	Volumen x7 ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O Milli-Q	13.3	93.1
Buffer Green GoTaq 5X (Promega)	5.0	35.0
Oligonucleótido pGAPF (5 $\mu\text{M}$ )	2.5	17.5
Oligonucleótido 3BGALGS (5 $\mu\text{M}$ )	2.5	17.5
dNTP (Bioline) (10 mM)	0.5	3.5
GoTaq Flexi DNA Polimerasa (Promega) (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.2	2.4
Células tratadas con liticasa*	1.0	-
Volumen total de reacción	25.0	

\*Se empleó como control positivo 1  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 de la ligación II de la primera construcción, y como control negativo, 1  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O Milli-Q.

#### **6.4.4.13. Caracterización fenotípica por ensayo de $\beta$ -galactosidasa**

Las clonas 1 y 2 de *P. pastoris* resultantes de la electroporación (**6.4.4.11.2**) se cultivaron en medio BMG, inoculando 10 mL de medio BMG contenidos en un tubo de 50 mL estéril con 200  $\mu\text{L}$  de cultivo, por cada clona. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 250 rpm por ~24 h. El sobrenadante de 2 mL de cultivo se obtuvo por centrifugación por 7 min a 6000 rpm a 4 °C y se vertió en un tubo de 2 mL nuevo y estéril. Con este sobrenadante, se realizó el ensayo de actividad de  $\beta$ -galactosidasa siguiendo el protocolo descrito en el apartado **6.3.3.5**, modificando el volumen de muestra empleada en la reacción a 50  $\mu\text{L}$ . Debido a que no se detectó actividad de  $\beta$ -galactosidasa con este protocolo estándar, se realizaron modificaciones al protocolo en distintos ensayos. En uno de éstos, se extendió el tiempo de reacción a 2 días con incubación a 30 °C. En otro ensayo, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de ONPG a 1 mL de sobrenadante del cultivo de las clonas 1 y 2 sin diluir (pH ~5.7) y se incubaron las reacciones a 50 °C (temperatura óptima de la enzima)



por 1 h. Ya que tampoco se observó desarrollo de color, se modificaron las condiciones del ensayo para que coincidieran con los parámetros reportados en el artículo de la expresión de la enzima en *P. pastoris* (Katrolia et al. 2011), empleando para la reacción ONPG 1.5 mg/mL preparado con buffer de citratos 50 mM pH 5 y añadiendo 250  $\mu$ L de ONPG 1.5 mg/mL pH 5 a 200  $\mu$ L de sobrenadante. Se incubó a 45 °C sin desarrollo de color después del tiempo de incubación.

Un tamizaje alternativo se efectuó para verificar si las colonias de *P. pastoris* KM71bGalgs de la primera transformación presentaban actividad de  $\beta$ -galactosidasa. A una placa de agar YPD se le agregaron 50  $\mu$ L de X-gal (Promega), se esparció el reactivo con un asa bacteriológica estéril en la superficie de la placa y se esperó a que el agar absorbiera el reactivo. En el reverso de la placa se marcaron 34 cuadros (un rectángulo de 5x6 cuadros y 4 extra). En la placa de agar YPD con X-gal se inocularon en total 30 colonias de la primera transformación de *P. pastoris* KM71 con pGAHbGalgs, sembrando una colonia por cuadrante en el rectángulo de 5x6 cuadros. Los cuadros extra de la placa se emplearon para sembrar controles de actividad de  $\beta$ -galactosidasa, depositando una asada de cultivo de las cepas KM71LAC421, KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC por cuadro. La placa se incubó a 30 °C por 4 días, y se registró el color de las células.

#### **6.4.5. Segunda construcción del plásmido pGAHbGalgs**

Debido a que las células de *P. pastoris* KM71bGalgs derivadas del primer intento de transformación no mostraron actividad de  $\beta$ -galactosidasa, y a ambigüedades en el tamaño del inserto b-Galgs derivado de pCC1-b-GalgsE, se decidió repetir el proceso de construcción de la cepa, esta vez comenzando desde la transformación de *E. coli* TOP10 con el plásmido pCC1-b-GalgsL.

##### **6.4.5.1. Transformación de *E. coli* TOP10 a partir de pCC1-b-GalgsL liofilizado**

Para la transformación, se resuspendieron los ~4  $\mu$ g del plásmido pCC1-b-GalgsL liofilizado (enviado por GenScript) en 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril, según las instrucciones de la compañía. Se le dio un *spin* en la centrífuga, y luego se preparó una dilución 1:5 del plásmido (1  $\mu$ L de plásmido pCC1-b-GalgsL en 4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril) en un tubo de 0.2 mL nuevo y estéril. La dilución se cuantificó por

espectrofotometría en un nano-espectrofotómetro, resultando en 33.5 ng/μL. El plásmido pCC1-b-GalgsL resuspendido se calentó a 65 °C por 20 min para inactivar nucleasas, se le dio un *spin* en la centrifuga y se almacenó a -20 °C.

Se realizó la transformación de *E. coli* TOP10 calciocompetente con 3 μL de la dilución 1:5 de pCC1-b-GalgsL ya mencionada. La transformación se efectuó de forma similar a la descrita en el apartado **6.4.2.12**, sin embargo, las placas se incubaron a temperatura ambiente debido a que se dejarían creciendo por dos días. Una vez crecidas las colonias resultantes de la transformación con el plásmido pCC1-b-GalgsL liofilizado en la placa, se sembraron tres colonias transformantes en 10 mL de medio LB con cloranfenicol 25 μg/mL. Se incubaron a 37 °C y 250 rpm overnight para su conserva (**6.4.2.13**) y para la extracción de DNA plasmídico con el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Cat. A1330) (**6.4.2.2**) a partir de las clonas 1 y 2, con el fin de caracterizar el plásmido mediante análisis con enzimas de restricción.

#### 6.4.5.2. Caracterización del plásmido pCC1-b-GalgsL por análisis de restricción

La caracterización mediante enzimas de restricción de los plásmidos pCC1-b-GalgsL obtenidos previamente (**6.4.5.1**) a partir de los cultivos de las colonias 1 y 2 se llevó a cabo en un volumen total de reacción de 20 μL, de la forma que se indica en la **Tabla 47**, con 5 U de las enzimas EcoRI, XhoI y BglII (Promega). Se emplearon 10 μL de plásmido por reacción.

**Tabla 47.** Preparación de reacciones para caracterización con enzimas de restricción del plásmido pCC1-b-Galgs.

Reactivo	Volumen x1 (μL)	Volumen x3 (μL)	División del coctel
H <sub>2</sub> O Milli-Q estéril	7.3	21.9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 17.5 μL + 2 μL Buffer H (10X) + 0.5 μL EcoRI 10 U/μL (Promega)</li> <li>• 35 μL + 4 μL Buffer D (se dividió así ↓)</li> <li>○ 19.5 μL + 0.5 μL XhoI 10 U/μL (Promega)</li> <li>○ 19.5 μL + 0.5 μL BglII 10 U/μL (Promega)</li> </ul>
BSA 100X	0.2	0.6	
DNA plasmídico*	10.0	30.0	
Volumen total del coctel	17.5	55.5 →	

\*pCC1-b-GalgsL extraídos con kit a partir de las clonas 1 y 2 (**6.4.5.1**).

#### 6.4.5.3. Aislamiento de plásmido pCC1-b-GalgsL a mediana escala

Se inocularon 80 mL de medio LB con cloranfenicol 25 μg/mL con 100 μL de los cultivos de las colonias 1 y 2 de *E. coli* TOP10 pCC1-b-GalgsL (**6.4.5.1**), un cultivo por cada una, en matraces estériles de 250 mL. Se incubaron a 30 °C y 250 rpm por ~24 h.

Posteriormente, se realizaron preparaciones de DNA plasmídico a mediana escala (empleando el protocolo del apartado **6.4.2.4**) a partir de estos cultivos, partiendo de paquetes celulares obtenidos a partir de 40 mL de medio (dos por cada colonia) y resuspendiendo el plásmido en un volumen final de 250  $\mu$ L de TE 1X por preparación. Se obtuvieron dos preparaciones por cultivo de cada colonia, las cuales se analizaron por electroforesis y se calentaron a 65 °C por 15 min para inactivar nucleasas. Una vez que las preparaciones de DNA se equilibraron a la temperatura ambiente, se adicionaron a cada una 0.5  $\mu$ L de RNase ONE 10 U/ $\mu$ L (Promega) y se incubaron a 37 °C por ~20 h. Posteriormente, se reextrajeron con solventes orgánicos (**6.4.2.5**) y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de TE 1X. Las muestras reextraídas se cuantificaron por espectrofotometría en un nano-espectrofotómetro y se analizaron por electroforesis. Finalmente, las muestras se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), como se describe en el apartado **6.4.2.6**, añadiendo 100  $\mu$ L de solución de unión a membrana a cada muestra antes de proceder con el protocolo, y eluyendo el DNA con 100  $\mu$ L totales de agua libre de nucleasas en dos centrifugaciones de 50  $\mu$ L. Las muestras se cuantificaron por espectrofotometría después de cada elución, se analizaron al final por electroforesis, se calentaron a 65 °C por 15 min para inactivar nucleasas y se almacenaron a -20 °C.

#### **6.4.5.4. Reacción de restricción a escala preparativa del plásmido pCC1-b-GalgsL con XhoI y NotI para purificación de banda de inserto**

Se realizó un ensayo de restricción a escala preparativa con las enzimas de restricción XhoI y NotI (Promega) del plásmido pCC1-b-GalgsL extraído de la colonia 2 (muestra A) tratado con RNasa, reextraído y purificado (**6.4.5.3**), ya que obtuvo la mayor concentración de las cuatro muestras. La reacción empleó los volúmenes de reactivos indicados en la **Tabla 48** y se incubó a 37 °C por ~16 h.

**Tabla 48.** Volúmenes de reactivos para la digestión preparativa de pCC1-b-Galgs.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b>
Plásmido pCC1-b-GalgsL (55.5 ng/ $\mu$ L)	72.5
H <sub>2</sub> O Milli-Q	3.1
Buffer D 10X (Promega)	9.0
BSA 100X (Promega)	0.9
XhoI 10 U/ $\mu$ L (Promega)	4.0
NotI 80 U/ $\mu$ L (Promega)	0.5
Volumen total de la reacción	90

\*Plásmido: pCC1-b-GalgsL (colonia 2, A), tratado con RNasa, reextraído y purificado.

A partir de la digestión preparativa descrita previamente, se realizó una electroforesis para minimizar la degradación del DNA (6.4.2.8) para la purificación del inserto. En cada uno de los dos carriles se cargó una mezcla de 45  $\mu$ L reacción de digestión preparativa con 10  $\mu$ L de buffer de carga y 5  $\mu$ L de GelRed 30X. Las condiciones de la electroforesis fueron 80 min a 100 V y 84 mA. Terminada la electroforesis, el fragmento de DNA se cortó del gel de agarosa y se purificó como se describe en el apartado 6.4.2.10, eluyendo el DNA con 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas en dos centrifugaciones con 25  $\mu$ L. Se calentó la muestra a 65 °C y se retiró el agua que se condensó en la tapa para concentrar la muestra, resultando en un total de 33  $\mu$ L de inserto purificado. El inserto b-Galgs obtenido, así como el vector pGAH almacenado (cuya obtención se describió en el apartado 6.4.4.5) se analizaron por electroforesis.

#### **6.4.5.5. Ligación del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la segunda construcción**

El inserto b-Galgs purificado (6.4.5.4) presentó degradación, pese a lo cual se decidió emplearlo en la reacción de ligación esperando que una parte de las moléculas de la preparación no estuviesen degradadas. La ligación se llevó a cabo con los volúmenes de reactivos que se indican en la columna Ligación A de la **Tabla 49**, se incubó 3:30 h a temperatura ambiente y posteriormente se almacenó a 4 °C hasta el día siguiente. Sin embargo, por equivocación, durante la preparación de la reacción se añadió *Rapid Ligation Buffer 2X* en lugar de *Ligase Buffer 10X*, por lo que se decidió hacer una nueva ligación (Ligación B) con el volumen restante de inserto b-Galgs que no se usó en la ligación anterior (Ligación A). Para la Ligación B, se usaron los volúmenes de reactivos indicados en la **Tabla 49** en la columna Ligación B, y se incubó 3:00 h a temperatura ambiente. A pesar del error, la Ligación A se analizó por electroforesis, presentando una banda de tamaño superior a la del vector, por lo tanto, se asumió que existió ligación y tanto la ligación A como la B se usaron en la transformación de *E. coli* TOP10.

**Tabla 49.** Volúmenes de reacción para la ligación del segundo intento de construcción del plásmido.

<b>Reactivo</b>	<b>Ligación A Volumen (µL)</b>	<b>Ligación B Volumen (µL)</b>
Inserto b-Galgs (6.4.5.4)	15	10.7
Vector pGAH (~10 ng/µL) (6.4.4.5)	2.0	2.0
<i>Ligase Buffer</i> 10X (Promega)	2.0*	1.5
T4 DNA ligase 3 U/µL (Promega)	1.0	0.8
Volumen total de la reacción	20.0	15.0

\*En la ligación A, se añadió por error el buffer *Rapid Ligation Buffer* 2X (Promega).

#### **6.4.5.6. Transformación de *E. coli* TOP10 calciocompetente con la segunda construcción de pGAHbGalgs**

Se realizó la transformación de células de *E. coli* TOP10 calciocompetentes (6.4.2.11) con 5 µL de las ligaciones A y B descritas en el apartado 6.4.5.5. Se utilizó una alícuota de 100 µL de células calciocompetentes por ligación y otra alícuota para los controles de viabilidad y susceptibilidad al antibiótico. Sin embargo, a diferencia del protocolo descrito previamente (6.4.2.12), las células permanecieron 1 h en la primera incubación en hielo, el choque térmico a 42 °C duró 35 s, y las placas sembradas (de agar LB con ampicilina 100 µg/µL y LB para el control de viabilidad) se incubaron a temperatura ambiente por ~16 h. Después de la incubación, se inocularon 11 colonias de la placa de células transformadas con la Ligación A (7 colonias sin colonias satélites, 2 con pocas colonias satélites y 2 con varias colonias satélites) y 13 de la placa de células transformadas con la Ligación B (9 colonias sin colonias satélites, 2 con pocas colonias satélites y 2 con varias colonias satélites) en 5 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/µL contenidos en un tubo de 15 mL estéril. Los cultivos se incubaron a 37 °C y 250 rpm por ~24 h.

#### **6.4.5.7. Caracterización por PCR de *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción**

A partir de los cultivos de las colonias de *E. coli* TOP10 transformadas (6.4.5.6) se realizaron preparaciones de DNA plasmídico por lisis alcalina (6.4.2.1). Para caracterizar los plásmidos extraídos de las colonias, se realizaron una serie de reacciones de PCR empleando los oligonucleótidos dirigidos al promotor (pGAPF) y a una secuencia interna del gen sintético (3BGALGS), para confirmar la construcción del plásmido pGAHbGalgs.

Primero, se realizó una caracterización preliminar por PCR de los plásmidos obtenidos a partir de las colonias numeradas como 1, 2 y 3, obtenidas tanto de la transformación con la ligación A (1A, 2A, 3A) como de la transformación con la ligación B (1B, 2B, 3B). Se incluyó un control negativo de PCR, así como un control positivo (plásmido pGAHbGalgs de la primera construcción) y un control negativo (plásmido pGAHFTEII). Se realizó una mezcla para 9 reacciones, como se indica en la **Tabla 50** (columna de volumen x9), y se les agregó a cada uno una dilución 1:100 (2  $\mu$ L de DNA + 198  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q) del plásmido a analizar. Las reacciones se colocaron en el termociclador, con el programa de PCR descrito en la **Tabla 41**. Una vez terminado el programa, las reacciones se analizaron por electroforesis.

**Tabla 50.** Volúmenes de reactivos para PCR para caracterización de plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción de colonias transformantes de *E. coli* TOP10.

Reactivo	Volumen x1 ( $\mu$ L)	Volumen x5 ( $\mu$ L)	Volumen x9 ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	11.8	59.0	106.2
Green Buffer Flexi 5X (Promega)	5.0	25.0	45.0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5	7.5	13.5
Oligonucleótido pGAPF (5 $\mu$ M)	2.5	12.5	22.5
Oligonucleótido 3BGALGS (5 $\mu$ M)	2.5	12.5	22.5
dNTPs (10 mM)	0.5	2.5	4.5
GoTaq Flexi (Promega) (5 U/ $\mu$ L)	0.2	1.0	1.8
DNA plasmídico	1.0	<sub>B,C</sub>	<sub>A</sub>
Volumen total de reacción	25.0		

<sup>A</sup>Diluciones 1:100 de plásmidos de colonias 1A, 2A, 3A, 1B, 2B, 3B, pGAHbGalgs de la primera construcción (control positivo) o pGAHFTEII (control negativo), o H<sub>2</sub>O Milli-Q (control negativo).

<sup>B</sup>Diluciones 1:10 de las mezclas A, B, S o de la ligación empleada para la transformación B, o H<sub>2</sub>O Milli-Q (control negativo).

<sup>C</sup>Diluciones 1:10 de plásmidos de colonias 4B, 5B, 6B, 7B, 8B, 9B, de las ligaciones A o B (control positivo), o H<sub>2</sub>O Milli-Q (control negativo).

Debido a que ninguna de las muestras analizadas presentó amplificación con los oligonucleótidos empleados, se llevaron a cabo ensayos de PCR adicionales para comprobar que al menos una colonia seleccionada tuviese el plásmido pGAHbGalgs construido correctamente. Se prepararon tres mezclas de plásmidos, nombradas A, B y S, con 2  $\mu$ L de cada uno de los plásmidos extraídos de la forma que se indica: 1) la mezcla A se realizó con los plásmidos de las colonias 1 a 7 de la transformación con la ligación A, 2) la mezcla B se realizó con los plásmidos de las colonias 1 a 9 de la transformación con la ligación B, y 3) la mezcla S se realizó con los plásmidos de las 4 colonias con colonias satélite tanto de la transformación con la ligación A como la de la ligación B (8

colonias en total). Las mezclas A, B y S se emplearon para hacer un ensayo de PCR con los oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS, además se incluyó un control negativo de PCR (H<sub>2</sub>O Milli-Q), así como un control positivo (Ligación B). Se realizó una mezcla de reacción para 5 ensayos, como se indica en la **Tabla 50** (columna de volumen x5), se dividió la mezcla en alícuotas de 24 µL en tubos de 0.2 mL, y se les agregó a cada alícuota correspondiente 1 µL de una dilución 1:10 (2 µL de DNA + 18 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q) de cada mezcla A, B o S, de la ligación B o de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Las reacciones se colocaron en el termociclador, con el programa de PCR descrito en la **Tabla 41**. Una vez terminado el programa, las reacciones se analizaron por electroforesis.

La mezcla de reacción B presentó amplificación, por lo cual se realizó el análisis por PCR de los plásmidos extraídos de las colonias 4 a 9 obtenidas de la transformación con la ligación B (4B, 5B, 6B, 7B, 8B, 9B). Se incluyó un control negativo de PCR (H<sub>2</sub>O Milli-Q), así como un control positivo (Ligación B) y la muestra de la Ligación A, para determinar si había ocurrido la ligación correcta en ésta. Se realizó una mezcla de reacción para 9 ensayos, como se indica en la **Tabla 50** (columna de volumen x9), se dividió la mezcla en alícuotas de 24 µL en tubos de 0.2 mL, y se les agregó a cada alícuota correspondiente 1 µL de una dilución 1:10 (1 µL de DNA + 9 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q) de las muestras a analizar. Las reacciones se colocaron en el termociclador, con el programa de PCR descrito en la **Tabla 41**. Una vez terminado el programa, las reacciones se analizaron por electroforesis. Se determinó que la única colonia que contenía el plásmido pGAHbGalgs era la colonia 8 de la transformación con la Ligación B (colonia 8B), por lo que se empleó para la posterior obtención del plásmido.

#### **6.4.5.8. Obtención del plásmido pGAHbGalgs (segunda construcción) linealizado para la transformación de *P. pastoris* KM71**

##### **6.4.5.8.1. Aislamiento del plásmido pGAHbGalgs a mediana escala**

Se inocularon 80 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL con 200 µL de cultivo de la colonia 8B en un matraz de 250 mL, el cual se incubó a 30 °C y 250 rpm por ~24 h. Se realizó un miniprep de DNA plasmídico (**6.4.2.2**) a partir de 4 mL del cultivo y se procesaron 70 mL del cultivo con el protocolo de midiprep (**6.4.2.4**), empleando dos paquetes celulares obtenidos de 35 mL de cultivo cada uno. Se obtuvieron 100 µL de la

preparación del miniprep y 250  $\mu\text{L}$  de cada preparación de midiprep. Las muestras obtenidas se analizaron por electroforesis y se calentaron a 65  $^{\circ}\text{C}$  por 15 min para inactivar nucleasas. Se adicionaron 0.5  $\mu\text{L}$  de RNase ONE 10 U/  $\mu\text{L}$  (Promega) a los 2 midipreps y se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  por  $\sim$ 16 h. Las muestras se reextrajeron con solventes orgánicos (6.4.2.5), se analizaron por electroforesis y se cuantificaron en nano-espectrofotómetro.

#### 6.4.5.8.2. Reacciones de restricción a escala analítica y preparativa del plásmido pGAHbGalgs

Se realizó una digestión analítica con Sall de las preparaciones de DNA plasmídico obtenidas de la colonia 8B (descritas en el apartado 6.4.5.8), para verificar si era posible llevar a cabo la digestión preparativa que se emplearía en la transformación de *P. pastoris*. Para analizar las preparaciones de miniprep y las dos de midiprep, se realizó una mezcla de reacción para tres ensayos de digestión analítica con Sall, como se muestra en la **Tabla 51**. La mezcla de reacción se distribuyó en tres tubos nuevos y estériles de 0.2 mL, depositando 15  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción en cada uno. A uno se le añadieron 5  $\mu\text{L}$  de miniprep de pGAHbGalgs, y a los otros, 1  $\mu\text{L}$  de pGAHbGalgs 1 o 2 (reextraído) y 4 de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Las reacciones se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 2 h, posteriormente se analizaron por electroforesis.

**Tabla 51.** Mezcla de reacción para digestiones analíticas de pGAHbGalgs de la segunda construcción con Sall.

Reactivo	Volumen x1 ( $\mu\text{L}$ )	Volumen x3 ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O Milli-Q	12.8	38.4
Buffer 10X	2.0	6.0
Sall 50 U/ $\mu\text{L}$ (Takara)	0.2	0.6
DNA plasmídico*	5.0	-
Volumen total de la reacción	20.0	

\*El coctel se dividió en 3 reacciones de 15  $\mu\text{L}$ , a una se le añadieron 5  $\mu\text{L}$  de pGAHbGalgs extraído con kit, y a las restantes, 1  $\mu\text{L}$  de pGAHbGalgs 1 (1790 ng/ $\mu\text{L}$ ) o 2 (7350 ng/ $\mu\text{L}$ ) y 4 H<sub>2</sub>O Milli-Q.

Tras comprobarse el corte analítico con Sall, se realizaron dos reacciones de restricción con Sall a escala preparativa empleando las dos preparaciones de midiprep del plásmido pGAHbGalgs obtenidas de la clona 8B de la segunda construcción. Los reactivos y volúmenes empleados para cada una las reacciones se muestran en la **Tabla 52**. Se hicieron dos preparaciones, una por muestra de DNA plasmídico. Las reacciones se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  por  $\sim$ 16 h.



**Tabla 52.** Mezcla de reacción para digestión preparativa de pGAHbGalgs de la segunda construcción con Sall.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O Milli-Q	38.5
Buffer 10X	10.0
Sall 50 U/ $\mu\text{L}$ (Takara)	1.5
DNA plasmídico*	50.0
Volumen total de la reacción	100.0

\*Plásmido: pGAHbGalgs 1 (1790 ng/ $\mu\text{L}$ ) o 2 (7350 ng/ $\mu\text{L}$ ) (reextraídos).

#### **6.4.5.8.3. Limpieza y concentración de las reacciones de restricción a escala preparativa del plásmido pGAHbGalgs**

Las digestiones preparativas de pGAHbGalgs se analizaron mediante electroforesis. Una vez verificada su integridad, las reacciones se concentraron en cartuchos Millipore (de la forma descrita en el apartado **6.4.2.7**), y posteriormente se realizó una dilución 1:10 de cada reacción (1  $\mu\text{L}$  de DNA + 9  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O Milli-Q) para su cuantificación y su análisis por electroforesis. La preparación de pGAHbGalgs 2 linealizado con Sall se eligió para ser concentrada. Primero, la muestra se calentó a 65 °C por 15 min para inactivar nucleasas, y se dividió en dos alícuotas (nombradas 2a y 2b) de 40  $\mu\text{L}$ , las cuales se concentraron a un volumen de 10  $\mu\text{L}$  con el programa 3 del CentriVap por 20 min, de forma similar a la descrita en el apartado **6.4.4.10.4**, aunque en esta ocasión no se utilizó un contrapeso y el volumen final de 10  $\mu\text{L}$  se marcó en cada tubo. Se realizó una dilución 1:10 de cada muestra concentrada (1  $\mu\text{L}$  de DNA + 9  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O Milli-Q) para su cuantificación con el nano-espectrofotómetro y su análisis por electroforesis.

#### **6.4.5.9. Transformación de *P. pastoris* KM71 con el plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción**

La transformación de *P. pastoris* KM71 con pGAHbGalgs linealizado con Sall se realizó de forma similar a la indicada en el apartado **6.4.4.11**. Se usó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de *P. pastoris* KM71 electrocompetente (**6.4.4.11.1**) preparada el día anterior a la transformación y almacenada a -20 °C, la cual se dividió en dos alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  en tubos de 2 mL estériles. Una se empleó para la electroporación y la otra se usó como control. Para la transformación, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de la preparación de pGAHbGalgs 2b linealizado con Sall y concentrado (1.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 12.5  $\mu\text{g}$  totales). Se siguió el proceso de electroporación y siembra ya descrito en el apartado **6.4.4.11.2**.

#### **6.4.5.10. Caracterización fenotípica de *P. pastoris* KM71bGalgs de la segunda transformación**

Se realizó un tamizaje para detectar si las colonias de *P. pastoris* KM71bGalgs obtenidas (6.4.5.9) presentaban actividad de  $\beta$ -galactosidasa, similar al descrito en el apartado 6.4.4.13. A dos placas de agar YPD se les agregaron 50  $\mu$ L de X-gal 50 mg/mL (Promega), se esparció el reactivo con un asa bacteriológica estéril por toda la placa y se esperó a que el agar absorbiera el reactivo. Previamente, en las placas se marcaron 34 cuadros (un rectángulo de 5x6 cuadrantes y 4 extra). En las placas de agar YPD con X-gal se sembraron en total 60 colonias, 30 por placa, provenientes de una de las placas de RDB sin histidina sembrada con 100  $\mu$ L de células electroporadas. Se sembró una colonia por cuadro, en el rectángulo de 5x6 cuadros. Los cuadros extra de cada placa se emplearon para sembrar un control de actividad de  $\beta$ -galactosidasa, depositando una asada de cultivo de las cepas KM71LAC421, KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC por cuadrante. Las placas se incubaron a 30 °C. Se registró si las colonias desarrollaron coloración azul.

#### **6.4.5.11. Caracterización de cepas de *P. pastoris* pGAHbGalgs de la segunda construcción por PCR**

Las colonias 1 y 2 de la segunda transformación se inocularon, a partir de la placa de YPD con X-gal, en 10 mL de medio YPD contenidos en un tubo de 50 mL estéril, y se incubaron a 30 °C y 250 rpm por ~16 h. Se extrajo DNA genómico a partir de 4 mL de cada cultivo según el protocolo del apartado 6.4.5.11.1, y la pastilla final de DNA se resuspendió en 30  $\mu$ L de TE 1X.

Las preparaciones de DNA genómico se utilizaron para hacer una caracterización por PCR. Se usaron dos pares de oligonucleótidos: pGAPF y 3BGALGS, y 5BGALGS y 3BGALGS. Se prepararon tres reacciones (control negativo, colonia 1 y colonia 2) por cada par de oligonucleótidos, según la mezcla de reacción presentada en la **Tabla 53**. Las mezclas se distribuyeron en alícuotas de 24  $\mu$ L en tubos de 0.2 mL nuevos y estériles. Se usó 1  $\mu$ L de las diluciones 1:10 (1  $\mu$ L de DNA + 9  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q) de las preparaciones de DNA genómico o de H<sub>2</sub>O Milli-Q para completar la reacción. Se empleó el programa de termociclador mostrado en la **Tabla 41** para la caracterización con los

oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS, modificando la temperatura de fusión a 53 °C para la caracterización con los oligonucleótidos 5BGALGS y 3BGALGS.

**Tabla 53.** Mezcla de reacción para caracterización por PCR de la cepa de *P. pastoris* KM71 pGAHbGalgs de la segunda construcción.

Reactivo	Volumen x1 (µL)	Volumen x3 (µL)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	11.8	35.4
Green Buffer Flexi (5X)	5.0	15.0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5	4.5
Oligonucleótido 1* (5 µM)	2.5	7.5
Oligonucleótido 2* (5 µM)	2.5	7.5
dNTPs (10 mM)	0.5	1.5
GoTaq Flexi (5 U/µL)	0.2	0.6
DNA genómico 1:10	1.0	-
Volumen total de reacción	25.0	

\*Pares de oligonucleótidos empleados: pGAPF y 3BGALGS, y 5BGALGS y 3BGALGS.

#### 6.4.5.11.1. Aislamiento de DNA genómico de células de levadura por el método de TSNT

El paquete celular para procesar se obtuvo por centrifugaciones sucesivas de 4 mL de cultivo de levadura en un tubo de 2 mL nuevo y estéril, el sobrenadante se decantó, se agregaron 200 µL de solución amortiguadora de lisis TSNT y se agitó por inversión hasta la resuspensión total del paquete celular. A continuación, se añadieron 500 µL de fenol saturado y se agitó por inversión 20 veces. Se añadieron 100 µL de SEVAG y se mezcló en vórtex por 5 min, después se agregaron 200 µL de TE 1X, se agitó por inversión de 3 a 5 veces y se centrifugó por 10 min a 14000 rpm. La fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo de 2 mL nuevo y estéril, se agregó 1 volumen de etanol absoluto frío y se mezcló cuidadosamente por inversión. La mezcla se centrifugó por 10 min a 14000 rpm y 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol 70 %. Se centrifugó por 5 min a 14000 rpm y 4 °C, se descartó el sobrenadante y se dejó secando el tubo con la pastilla invertido sobre papel secante por ~15 min para eliminar los restos de etanol. La pastilla se resuspendió en 50 µL de TE 1X y se calentó por 15 min a 65 °C para inactivar nucleasas. La muestra se almacenó a 4 °C para su empleo a corto plazo o a -20 °C para su conservación.

#### 6.4.6. Caracterizaciones por análisis de restricción de los plásmidos pCC1-b-Galgs y pGAHbGalgs empleados o derivados de la primera y segunda construcciones

Se realizó la caracterización mediante análisis de restricción con diversas enzimas de los plásmidos pCC1-b-Galgs y pGAHbGalgs empleados en los primeros dos intentos de generación de una cepa de *P. pastoris* productora de una  $\beta$ -galactosidasa extracelular, con el fin de buscar posibles alteraciones en el plásmido debido a la ausencia de actividad de  $\beta$ -galactosidasa en las colonias transformantes de *P. pastoris*. Debido a que se confirmó que la electroforesis con pre-tinción con GelRed afectaba la migración de las bandas de DNA (ver panel C de la **Figura 77** como ejemplo, en donde los marcadores de peso molecular presentan discrepancias en la migración) el análisis de las caracterizaciones por electroforesis se realizó con post-tinción con GelRed 3X.

La primera caracterización de los plásmidos se llevó a cabo con la enzima BglII. Se realizó la mezcla de reacción con los volúmenes de reactivos indicados en la **Tabla 54**. La mezcla de reacción se distribuyó en tubos de 0.2 mL, agregando 11.5  $\mu$ L en cada tubo. Posteriormente se añadieron 9.5  $\mu$ L del plásmido pCC1-b-Galgs o pGAHbGalgs a analizar (ver nota sobre las condiciones de cultivo de las cepas de las que se extrajeron los plásmidos en la **Tabla 54**). Las reacciones se incubaron por 2 h a 37 °C. Después de la incubación, las reacciones se analizaron mediante electroforesis, empleando post-tinción con GelRed como se describe en el apartado **6.4.6.1**.

**Tabla 54.** Volúmenes de reactivos para las mezclas de reacción empleadas en la caracterización por análisis de restricción con BglII de los plásmidos pGAHbGalgs y pGAHFTEII.

Reactivo	Volumen x1 ( $\mu$ L)	Volumen x6 ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	7.8	46.8
Buffer D 10X (Promega)	2.0	12.0
BSA 100X (Promega)	0.2	1.2
BglII 10 U/ $\mu$ L (Promega)	0.5	3.0
DNA plasmídico*	9.5	-
Volumen total	20.0	-

\*Se empleó uno de los plásmidos siguientes por reacción: 1) midiprep de pCC1-b-GalgsE de *E. coli* EPI300 cultivada a 24 °C, 2) midiprep 4 de pGAHbGalgs de la primera construcción, 3) midiprep con kit de pGAHbGalgs de la primera construcción, 4) miniprep de kit de pCC1-b-GalgsL de colonia 1 de *E. coli* TOP10, 5) midiprep 2b de pCC1-b-GalgsL de *E. coli* TOP10, 6) miniprep de kit de pGAHbGalgs de la segunda construcción.

Después del análisis por electroforesis de las reacciones, se añadieron 0.3  $\mu\text{L}$  de la enzima de restricción XhoI (10 U/ $\mu\text{L}$ , Promega) a determinado volumen del resto de las reacciones de restricción con BglII preparadas previamente (el número de reacción corresponde al número de muestra de DNA descrita en la nota en la **Tabla 54**): a 7  $\mu\text{L}$  de la reacción 1, a 5  $\mu\text{L}$  de las reacciones 3 y 6, y a 12  $\mu\text{L}$  de la reacción 4. Las reacciones se incubaron por 90 min a 37 °C. Después de la incubación, las reacciones se analizaron mediante electroforesis empleando post-tinción para revelar las bandas (**6.4.6.1**).

Para delimitar con mayor precisión la región alterada en el plásmido pGAHbGalgs y determinar que el plásmido pGAHFTEII (origen del vector pGAH) se encontrara sin alteraciones desde el inicio de las construcciones, se realizaron tres mezclas de reacción con los volúmenes de reactivos indicados en la **Tabla 55**: una usando el plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción y buffer B (Promega) para cuatro reacciones, otra usando pGAHbGalgs y buffer B (Roche) para dos reacciones y otra usando pGAHFTEII y buffer D (Promega) para dos reacciones. Las mezclas de reacción se distribuyeron en tubos de 0.2 mL nuevos, agregando 19.5  $\mu\text{L}$  de cada mezcla. Se añadieron las enzimas de restricción correspondientes a las alícuotas de cada mezcla de reacción según el buffer que contuvieran (la distribución se indica en la **Tabla 55**). Las reacciones se incubaron por 1 h a 37 °C. Después de la incubación, las reacciones se analizaron mediante electroforesis empleando post-tinción para revelar las bandas (**6.4.6.1**).

**Tabla 55.** Volúmenes de reactivos para las mezclas de reacción empleadas en la caracterización mediante enzimas de restricción de los plásmidos pGAHbGalgs y pGAHFTEII.

Reactivo	Volumen x1 ( $\mu\text{L}$ )	Volumen x2 ( $\mu\text{L}$ )	Volumen x4 ( $\mu\text{L}$ )	Enzimas <sup>C</sup> añadidas a las alícuotas (19.5 $\mu\text{L}$ ) de las mezclas de reacción
H <sub>2</sub> O Milli-Q	12.3	24.6	49.2	• pGAHbGalgs + BBP: BglII / Csp45I + XhoI / BglII + XhoI / Csp45I + BglII
DNA plasmídico <sup>A</sup>	5.0	10.0	20.0	
Buffer 10X <sup>B</sup>	2.0	4.0	8.0	• pGAHbGalgs + BBR: HindIII / HindIII + BglII
BSA 100X	0.2	0.4	0.8	
Enzima(s) <sup>C</sup>	0.5	-	-	• pGAHFTEII + BDP: BglII / BglII + XhoI
Volumen total	20.0			

<sup>A</sup>DNA plasmídico: midiprep 1 de pGAHbGalgs de la segunda construcción, tratado con RNasa y reextraído, o preparación de pGAHFTEII.

<sup>B</sup>Buffer 10X: Buffers B (BBP) o D (BDP) de Promega o buffer B (BBR) de Roche.

<sup>C</sup>Enzimas: BglII, Csp45I, XhoI (Promega), HindIII (Roche), todas a 10 U/ $\mu\text{L}$ . Se añadieron 0.5  $\mu\text{L}$  de cada enzima cuando se usó una única enzima en la reacción, y 0.25  $\mu\text{L}$  cuando se usaron dos.

/: Separador de reacciones.

#### **6.4.6.1. Electroforesis en gel de agarosa con post-tinción**

El procedimiento se realizó como una electroforesis en gel estándar, pero únicamente depositando en los pocillos la mezcla de muestra y buffer de carga (Green Buffer 5X, Promega), sin añadir el colorante GelRed. Cada gel se preparó empleando agarosa al 0.8 o 1.5 % (según se indique) en buffer TBE 1X. La agarosa se fundió en microondas hasta observarse transparente y sin grumos y se vertió en un molde para gel ensamblado con empaques de plástico y peine para marcar los pocillos. Se esperó ~20 min a su solidificación, se retiraron los empaques y el peine del molde, y se depositó el gel en una cámara de electroforesis, la cual se rellenó con buffer TBE 1X hasta la marca. En cada pocillo se depositó una mezcla del marcador o muestra empleados con la cantidad correspondiente de buffer de carga (Green Buffer 5X, Promega), sin añadir colorante. Se realizó la electroforesis con los parámetros 100 V y 84 mA, teniendo como referencia la migración del buffer de carga para determinar el tiempo considerado para la resolución de las bandas de DNA. Una vez que la electroforesis se detuvo, el gel se sumergió en aproximadamente 50 mL de GelRed 3X (preparado en dilución con agua bidestilada) contenidos en una caja plástica, y se incubó en plataforma de agitación (*rocking platform*) por al menos 30 min en oscuridad.

#### **6.4.7. Tercera construcción del plásmido pGAHbGalgs**

Las caracterizaciones por análisis de restricción de los plásmidos pCC1-b-Galgs y pGAHbGalgs mostraron una alteración en el tamaño del inserto b-Galgs en éstos, excepto en el pCC1-b-GalgsL empleado en la segunda construcción. No era posible detectar esta alteración en la región amplificada en las caracterizaciones previas por PCR, al no encontrarse en la región amplificada. Esta alteración se podía haber detectado en las electroforesis de las digestiones del plásmido pCC1-b-GalgsE con XhoI y NotI, ya que el tamaño de la banda del inserto b-Galgs resultaba mayor a 4000 pb, siendo que teóricamente debía tener un tamaño de ~3000 pb (2995 pb). No se consideró esta alteración al inicio, ya que el plásmido pCC1-b-GalgsE provino de las células enviadas por GenScript, cuyo plásmido se encontraba secuenciado en el certificado de la orden, y se supuso que los fragmentos debían ser los esperados teóricamente. Una vez detectada la alteración, se realizó un tercer intento de construcción del plásmido pGAHbGalgs,

empleando *E. coli* TOP10 transformada con el plásmido pCC1-b-GalgsL liofilizado, e incubándolas siempre a temperatura ambiente para intentar evitar la mutación del plásmido.

#### **6.4.7.1. Transformación de *E. coli* TOP10 a partir de pCC1-b-GalgsL liofilizado, con incubación a temperatura ambiente**

Paralelamente a la transformación descrita en el apartado de la segunda construcción (6.4.5.1), se realizó la transformación de 100  $\mu$ L de células de *E. coli* TOP10 calciocompetentes con 2  $\mu$ L de una dilución 1:5 de pCC1-b-GalgsL similar a la usada en la transformación descrita en el apartado 6.4.5.1. Una vez añadido el medio de recuperación SOC, las células se incubaron a 24 °C y 300 rpm por 80 min en un bloque de calentamiento (Thermomixer R, Eppendorf). Se recuperaron las células por centrifugación por 5 min a 6000 rpm, se decantó el medio y las células se sembraron por extensión en agar LB con cloranfenicol 25  $\mu$ g/mL. La placa se incubó a temperatura ambiente por 2 días y se almacenó a 4 °C, ya que no se empleó en ese momento por haberse obtenido colonias de la transformación descrita en 6.4.5.1. Aproximadamente 25 días después, se inocularon 5 colonias (N1 a N5) de esta placa cada una en 6 mL de medio LB con cloranfenicol 25  $\mu$ g/mL contenidos en un tubo estéril de 15 mL, y se incubaron a temperatura ambiente en plataforma de agitación (*rocking platform*) por 6 días. Solamente se observó crecimiento en el cultivo de la colonia N4.

Se inocularon 80 mL de LB con cloranfenicol 25  $\mu$ g/mL contenidos en un matraz de 250 mL con 400  $\mu$ L del cultivo de la colonia N4, este cultivo se incubó a temperatura ambiente (con la incubadora destapada y sin encender el termostato) y 250 rpm por 24 h y se almacenó el cultivo a 4 °C. El cultivo se empleó para la preparación de DNA plasmídico a mediana escala como se describe en el apartado 6.4.2.4. Se obtuvieron 2 preparaciones de DNA, las cuales se resuspendieron en 300  $\mu$ L de TE 1X., que se trataron con 0.5  $\mu$ L de RNase ONE (Promega) y se incubaron a 37 °C por ~16 h. Se reextrajeron las muestras por solventes orgánicos según el proceso del apartado 6.4.2.5, y se resuspendieron en 200  $\mu$ L de TE 1X.

Debido a la probabilidad de que las colonias cultivadas (N1 a N5) no crecieran debido al almacenamiento en refrigeración, después de 2 días del cultivo de éstas se realizó

la transformación de 100  $\mu$ L de células de *E. coli* TOP10 calciocompetentes con 3  $\mu$ L de una nueva dilución 1:5 de pCC1-b-GalgsL. La incubación se realizó en hielo por 1 h, el choque térmico a 42 °C por 35 s e incubación en hielo por 2 min. Se adicionó 1 mL de medio SOC y se incubó a temperatura ambiente en plataforma de agitación (*rocking platform*) por 2 h. Las células se recuperaron por centrifugación por 5 min a 6000 rpm, se decantó el medio y se sembró por extensión en agar LB con cloranfenicol 25  $\mu$ g/mL (se incluyeron controles de viabilidad y susceptibilidad a ampicilina como se describió en los ensayos previos). Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 4 días. Tres colonias (nombradas 1 a 3) de la placa de transformación se inocularon, cada una, en 4 mL de LB con cloranfenicol 25  $\mu$ g/mL contenidos en un tubo de 15 mL. Se incubaron a temperatura ambiente en plataforma de agitación (*rocking platform*) por 24 h.

Como preparación para los procesos del siguiente apartado (6.4.7.2), se realizó un experimento para determinar si la temperatura de cultivo provocaba la alteración del plásmido pCC1-b-GalgsL en las cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido liofilizado. Se realizaron dos cultivos en los cuales se inocularon 100  $\mu$ L de cultivo de la colonia N4 (cultivada a temperatura ambiente) en 6 mL de LB con cloranfenicol 25  $\mu$ g/mL. Uno de los cultivos se incubó a 32 °C y 150 rpm, el otro se incubó a 37 °C y 250 rpm, por 24 h.

Se realizó la extracción de DNA plasmídico de la forma descrita en el apartado 6.4.2.2 a partir de 4 mL de los cultivos de la colonia de *E. coli* TOP10 pCC1-b-Galgs N4 (a temperatura ambiente, a 32 °C y a 37 °C) y de las colonias 1 (2 cultivos), 2 y 3 de la segunda transformación descrita en este mismo apartado.

#### **6.4.7.2. Caracterización con HindIII de pCC1-b-GalgsL**

Con el fin de demostrar que el plásmido pCC1-b-GalgsL no presentó alteraciones en su tamaño y que las preparaciones de plásmido obtenidas podían ser usadas para purificar el inserto, se realizó una caracterización del plásmido mediante análisis de restricción con la enzima HindIII. Se preparó la mezcla de reacción y las reacciones según se indica en la **Tabla 56**. Las reacciones se incubaron por 1 h a 37 °C, y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa con post-tinción. De igual forma, también se caracterizaron los DNA plasmídicos (minipreps) obtenidos en el apartado anterior



(6.4.7.1), con una reacción por separado para cada plásmidos en las que se emplearon 17.5  $\mu\text{L}$  de plásmido, 2  $\mu\text{L}$  de Buffer B 10X (Roche) y 0.5  $\mu\text{L}$  de HindIII 10 U/ $\mu\text{L}$  (Roche). Las reacciones se incubaron por 1:30 h a 37 °C, y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa con post-tinción.

**Tabla 56.** Mezcla de reacción para caracterización del plásmido pCC1-b-GalgsL con HindIII.

Reactivo	Volumen x1 ( $\mu\text{L}$ )	Volumen x2 ( $\mu\text{L}$ )	Preparación de las reacciones
H <sub>2</sub> O Milli-Q	7.5	15.0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 <math>\mu\text{L}</math> + 4 <math>\mu\text{L}</math> H<sub>2</sub>O Milli-Q + 6 <math>\mu\text{L}</math> pCC1-b-Galgs 1 (reextraído)</li> </ul>
Buffer B 10X (Roche)	2.0	4.0	
HindIII 10 U/ $\mu\text{L}$ (Roche)	0.5	1.0	
DNA plasmídico*	10.0	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 <math>\mu\text{L}</math> + 10 <math>\mu\text{L}</math> pCC1-b-Galgs 2 (reextraído)</li> </ul>
Volumen total de reacción	20.0		

\*Midipreps de pCC1-b-Galgs 1 o 2 extraídos de la colonia N4 cultivada a temperatura ambiente, reextraídos.

### 6.4.7.3. Reacción de restricción a escala preparativa del plásmido pCC1-b-GalgsL con XhoI y NotI para purificación de banda de inserto

Una vez caracterizado el plásmido pCC1-b-GalgsL de los midipreps de la colonia N4 cultivada a temperatura ambiente, se procedió a realizar un ensayo de restricción a escala preparativa del mismo con las enzimas XhoI y NotI. La reacción se preparó con los volúmenes de reactivos indicados en la **Tabla 57**, y se incubó a 37 °C por ~16 h. Después de la incubación, se realizó una electroforesis con post-tinción con el propósito de verificar que la restricción se hubiera llevado a cabo y que el tamaño del fragmento del inserto coincidiera con el tamaño esperado.

**Tabla 57.** Volúmenes de reactivos para la digestión preparativa de pCC1-b-Galgs en la tercera construcción.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Plásmido pCC1-b-GalgsL* (1.33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	90.0
Buffer D 10X (Promega)	10.0
BSA 100X (Promega)	1.0
XhoI 10 U/ $\mu\text{L}$ (Promega)	4.0
NotI 80 U/ $\mu\text{L}$ (Promega)	0.5
Volumen total de la reacción	105.5

\*Midiprep de pCC1-b-Galgs 1 extraído de la colonia N4 tratado con RNasa y reextraído con solventes orgánicos.

A partir de la digestión preparativa descrita previamente, se realizó una electroforesis para disminuir la degradación del DNA (descrita en el apartado 6.4.2.8) para la purificación del inserto. Se realizó una mezcla de 98  $\mu\text{L}$  de reacción de digestión

preparativa con 27  $\mu\text{L}$  de buffer de carga y 7  $\mu\text{L}$  de GelRed 100X, la cual se distribuyó entre los tres carriles de mayor tamaño del gel. Las condiciones de la electroforesis fueron 60 min a 100 V y 84 mA.

Una vez terminada la electroforesis, la banda del inserto b-Galgs se cortó y se purificó como se describió previamente (6.4.2.10), eluyendo el inserto con 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. El inserto b-Galgs obtenido se analizó por electroforesis con post-tinción, y se verificó la integridad del vector pGAH (se describió su obtención en el apartado 6.4.4.5) por el mismo procedimiento.

#### 6.4.7.4. Ligación del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la tercera construcción

Se llevó a cabo la reacción de ligación con el inserto b-Galgs (6.4.7.3) y el vector pGAH, mezclando los volúmenes de reactivos indicados en la **Tabla 58**. La reacción se incubó 3 h a temperatura ambiente, y posteriormente se almacenó a 4 °C por ~16 h. Se analizó la reacción por electroforesis con post-tinción, comprobando la ligación del inserto y el vector.

**Tabla 58.** Mezcla de reacción para la ligación de la tercera construcción.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Inserto b-Galgs (6.4.7.3)	8.0
Vector pGAH (6.4.4.5)*	2.0
H <sub>2</sub> O Milli-Q	2.7
Ligase Buffer 10X (Promega)	1.5
T4 DNA ligase 3 U/ $\mu\text{L}$ (Promega)	0.8
Volumen total de la reacción	15.0

\*El mismo que se empleó en las ligaciones de la primera y la segunda construcción.

#### 6.4.7.5. Transformación de *E. coli* TOP10 calciocompetente con la tercera construcción de pGAHbGalgs

Se realizó la transformación de *E. coli* TOP10 calciocompetente empleando 4  $\mu\text{L}$  de la ligación de la tercera construcción (apartado 6.4.7.4). La transformación se llevó a cabo de forma similar a la descrita en el apartado 6.4.4.8. Se utilizaron dos alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  de células competentes, a una de las cuales se le añadieron 4  $\mu\text{L}$  de la ligación de la tercera construcción. Las alícuotas se incubaron 1 h en hielo, se realizó el choque térmico a 42 °C por 35 s y se incubaron en hielo por 2 min. Se les adicionó 1 mL de medio SOC y se incubaron a temperatura ambiente en una plataforma de agitación por 2 h. Se

recuperaron las células tratadas con la reacción de ligación por centrifugación por 5 min a 6000 rpm, se decantó el medio y las células de cada alícuota se sembraron por extensión en placas de agar LB con ampicilina 100 µg/mL. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por ~42 h.

Una vez crecidas las colonias en la placa de las células transformadas, se sembraron 10 colonias en 6 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL contenido en un tubo de 15 mL estéril, y se incubaron a temperatura ambiente en una plataforma de agitación por ~42 h. De 10 colonias sembradas, 8 presentaron crecimiento (las denominadas 7 y 9 no crecieron).

#### **6.4.7.6. Caracterización por análisis de restricción de los plásmidos extraídos de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con la ligación pGAHbGalgs de la tercera construcción (I)**

La verificación de la identidad de los plásmidos de las colonias transformadas se efectuó con una caracterización con la enzima de restricción HindIII, ya que ésta podía determinar si la construcción de pGAHbGalgs era incorrecta por la presencia de bandas de ~900 y ~400 pb, adicionales a las bandas esperadas de 7355, 2062 y 1065 pb. Para esto, se extrajo DNA plasmídico (6.4.2.2) a partir de 4 mL de los cultivos de las colonias 1, 2 y 3 transformadas con la ligación de la tercera construcción (6.4.7.5), eluyendo el DNA con 100 µL de agua libre de nucleasas. Se determinó la concentración y calidad de los plásmidos mediante el nano-espectrofotómetro.

Los plásmidos extraídos se caracterizaron con HindIII. Se colocaron 17.5 µL de los DNA plasmídicos de las colonias 1, 2 y 3, cada uno en un tubo nuevo de 0.2 mL, y a cada uno se le agregaron 2 µL de Buffer B 10X (Roche) y 0.5 µL de la enzima HindIII 10 U/µL (Roche). Las reacciones se incubaron a 37 °C por 1 h. Posteriormente se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5 % con post-tinción.

Debido a que en el ensayo con HindIII no se obtuvo el patrón de bandas esperado para pGAHbGalgs, se decidió hacer una caracterización por análisis de restricción de las mismas muestras con la enzima BglII. Se colocaron 17 µL de los DNA plasmídicos de las colonias 1, 2 y 3, cada uno en un tubo nuevo de 0.2 mL, y se les agregaron 2 µL de Buffer D 10X (Promega), 0.2 µL de BSA 100X (Promega) y 0.8 µL de la enzima BglII 10 U/µL

(Promega). Las reacciones se incubaron a 37 °C por 30 min. Posteriormente se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 % con post-tinción.

Nuevamente, ninguno de los patrones de restricción de los plásmidos coincidió con los esperados, por lo que se extrajeron plásmidos (6.4.2.3) de las colonias 4, 5, 6 y 8 de la misma transformación (6.4.7.5). Al finalizar la extracción, el DNA se eluyó con 50 µL de buffer de elución. Se diluyó 1 µL de RNase ONE (10 U/µL) en 3 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q y se agregó 1 µL de esta mezcla a cada muestra de DNA plasmídico extraída. Las muestras con RNasa no se incubaron a 37 °C antes de los análisis de restricción, sino que se incubaron en conjunto con la enzima de restricción cuando se preparó la reacción de restricción.

Se realizó la mezcla para un volumen de 4 reacciones para el análisis de restricción con BglII como indica la **Tabla 59**. Se distribuyó la mezcla en alícuotas de 10 µL en tubos nuevos de 0.2 mL y a cada tubo se le añadieron 10 µL de DNA plasmídico extraído de las colonias 4, 5, 6 u 8. Las reacciones se incubaron a 37 °C por 1 h y se analizaron por electroforesis con post-tinción. Ninguno de los patrones de restricción observados correspondió con el esperado.

**Tabla 59.** Volúmenes de reacción para análisis de restricción con BglII.

Reactivo	Volumen 1X (µL)	Volumen 4X (µL)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	7.0	28.0
Buffer D 10X (Promega)	2.0	8.0
BSA 100X (Promega)	0.2	0.8
BglII 10 U/µL (Promega)	0.8	3.2
DNA plasmídico	10.0	-
Volumen total de reacción	20.0	

#### 6.4.7.7. Caracterización por PCR de *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido pGAHbGalgs de la tercera construcción

Con el fin de caracterizar los plásmidos extraídos de las colonias transformadas con la ligación de la tercera construcción, se realizaron análisis por PCR de los plásmidos de la colonia 4, la cual presentó un patrón de restricción con BglII similar al de pGAHFTEII (plásmido del que se obtuvo el vector pGAH), y de la colonia 6, cuyo patrón de restricción no coincidía con ninguno de los teóricos. Para esto, se realizaron 4 mezclas de reacción con un volumen para 4 reacciones de PCR, cada una con uno de los siguientes pares de

oligonucleótidos: pGAPF y 3BGALGS, 5BGALGS y 3BGALGS, pGAPF y 3AOX (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'), o FTE1 (5'-CGCTGACAAGAACGGTTACA-3') y FTE2 (5'-CTTGTGGGTGGAAACCAATC-3'); según se indica en la **Tabla 60**. Se distribuyeron las mezclas en alícuotas de 24  $\mu$ L en tubos nuevos y estériles de 0.2 mL y se les agregó 1  $\mu$ L de una dilución 1:10 (1  $\mu$ L de muestra + 9  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q) de los plásmidos extraídos de las colonias 4 y 6 de la tercera construcción (apartado **6.4.7.6**), de los plásmidos pGAHbGalgs de la segunda construcción o pGAHFTEII como control positivo, o 1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q como control negativo. Las reacciones llevadas a cabo con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS, y 5BGALGS y 3BGALGS emplearon como control positivo el plásmido pGAHbGalgs derivado de la segunda construcción, mientras que las reacciones llevadas a cabo con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3AOX, y FTE1 y FTE2 usaron como control positivo plásmido pGAHFTEII. Las 16 reacciones se cargaron en el termociclador con el programa que se indica en la **Tabla 61** y, terminado el programa, se analizaron por electroforesis con post-tinción.

**Tabla 60.** Mezclas de reacción para PCR de plásmidos resultantes de la tercera construcción.

Reactivo	Volumen x1 ( $\mu$ L)	Volumen x4 ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	11.8	47.2
Green Buffer Flexi (5X)	5.0	20.0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5	6.0
Oligonucleótido 1* (5 $\mu$ M)	2.5	10.0
Oligonucleótido 2* (5 $\mu$ M)	2.5	10.0
dNTPs (10 mM)	0.5	2.0
GoTaq Flexi (5 U/ $\mu$ L)	0.2	0.8
DNA plasmídico**	1.0	-
Volumen total de reacción	25	

\*El par de oligonucleótidos empleado puede ser pGAPF y 3BGALGS, 5BGALGS y 3BGALGS, pGAPF y 3AOX, o FTE1 y FTE2.

\*\*Las muestras empleadas y los controles se describen en el texto.

**Tabla 61.** Programa de termociclador empleado para PCR con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS, 5BGALGS y 3BGALGS, pGAPF y 3AOX, y FTE1 y FTE2.

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	2:00
	94	0:30
30	52.5, 53, 55*	0:30
	72	3:30
1	72	10:00

\*Se programó el termociclador con bloques de distintas temperaturas: 52.5 °C para pGAPF y 3BGALGS, 53 °C para 5BGALGS y 3BGALGS, y 55 °C para pGAPF y 3AOX, y FTE1 y FTE2.

#### 6.4.7.8. Preparación de conjuntos de colonias transformantes de la tercera construcción del plásmido pGAHbGalgs y caracterización por PCR

Se levantaron colonias de la placa de transformación con la ligación de la tercera construcción con un asa bacteriológica en condiciones de esterilidad y se sembraron en una placa de agar LB con ampicilina 100 µg/mL, previamente marcada con cuadrantes, depositando una colonia por cuadrante. Tras la siembra, se depositó el resto de la colonia que quedaba en el asa en 100 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril en un tubo de 0.6 mL nuevo y estéril, y se esterilizó el asa quemándola en el mechero. Se repitió el proceso, utilizando el mismo tubo de agua para resuspender 14 colonias. Se formaron en total 7 conjuntos, identificados con letras de la A la G, de 14 colonias. Los conjuntos de colonias se almacenaron a -20 °C para su uso posterior en PCR. La placa de agar se incubó a temperatura ambiente.

Para la PCR de colonia se realizó una mezcla de reacción para un volumen de 9 reacciones como se indica en la **Tabla 62**. Se distribuyó la mezcla en alícuotas de 24 µL en tubos nuevos y estériles de 0.2 mL y se les agregó 1 µL de los conjuntos de colonias A G (1 conjunto por tubo), o 1 µL de una dilución 1:10 de plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción como control positivo, o 1 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q como control negativo. Las reacciones se cargaron en el termociclador con el programa de la **Tabla 63**, en el que se aumentó el tiempo del primer ciclo a 94 °C por ser PCR directo de colonias de *E. coli*, y finalizado el programa se analizaron por electroforesis con post-tinción.

**Tabla 62.** Mezcla de reacción para PCR de conjuntos de colonias resultantes de la tercera construcción.

Reactivo	Volumen x1 (µL)	Volumen x9 (µL)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	11.8	106.2
Green Buffer Flexi (5X)	5.0	45.0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5	13.5
Oligonucleótido pGAPF (5 µM)	2.5	22.5
Oligonucleótido 3BGALGS (5 µM)	2.5	22.5
dNTPs (10 mM)	0.5	4.5
GoTaq Flexi (5 U/µL)	0.2	1.8
Mezcla de colonias	1.0	-
Volumen total de reacción	25	

**Tabla 63.** Programa de termociclador para PCR de colonia con los oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS.

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	7:00
30	94	0:30
	52.5	0:30
	72	2:30
1	72	5:00

#### **6.4.7.9. Caracterización por análisis de restricción de los plásmidos extraídos de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con la ligación pGAHbGalgs de la tercera construcción (II)**

Se cultivaron las colonias sembradas en la placa (6.4.7.8) en 5 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL contenidos en un tubo estéril de 15 mL. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente en plataforma de agitación. Una vez crecidos (de 24 a 48 h), se extrajo DNA por lisis alcalina (6.4.2.1) a partir de 4 mL de cultivo y el resto del cultivo se guardó a 4 °C. A los DNA plasmídicos se les agregó 2 µL de una dilución 1:30 de RNase ONE (Promega).

Se hizo una mezcla de reacción para restricción con la enzima BglII, multiplicando los volúmenes de reacción de la **Tabla 64** por la cantidad de muestras de DNA plasmídico a analizar. Se distribuyó la mezcla de reacción en alícuotas de 5 µL en tubos de 0.2 mL nuevos y estériles, a los cuales se les agregaron 15 µL de DNA plasmídico. Las reacciones se incubaron a 37 °C por 1 h y se analizaron por electroforesis con post-tinción.

**Tabla 64.** Volúmenes de reacción para análisis de restricción con BglII.

Reactivo	Volumen x1 (µL)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	2.5
Buffer D 10X (Promega)	2.0
BSA 100X (Promega)	0.2
BglII 10 U/µL (Promega)	0.3
DNA plasmídico	15.0
Volumen total de reacción	20.0

#### **6.4.7.10. Caracterización mediante PCR de los plásmidos de las colonias de las tres construcciones**

Se realizó un conjunto de reacciones de PCR contra los plásmidos nombrados como pGAHbGalgs de las tres construcciones llevadas a cabo, y de la ligación empleada en la tercera construcción (6.4.7.4). Se emplearon los siguientes pares de oligonucleótidos:

pGAPF y 3BGALGS, 5BGALGS y 3BGALGS, pGAPF y 3AOX, y 5BGALGS y 3AOX. Se emplearon diluciones 1:10 (1  $\mu\text{L}$  de muestra + 9  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q) de las siguientes preparaciones de los plásmidos pGAHbGalgs: a) de la colonia 1 de la primera construcción, b) de la colonia 8B de la segunda construcción, c) de la colonia designada como D6 de la tercera construcción, d) de la colonia designada como B10 de la tercera construcción. También se utilizó una dilución 1:10 de la ligación de la tercera construcción. Se hicieron 4 mezclas de reacción con un volumen para 6 ensayos, una por par de oligonucleótidos antes mencionado, como se muestra en la **Tabla 65**. Se usó el programa de termociclador indicado en la **Tabla 66**. Las reacciones se analizaron por electroforesis con post-tinción.

**Tabla 65.** Mezcla de reacción para PCR para caracterización de plásmidos pGAHbGalgs de las tres construcciones.

Reactivo	Volumen x1 ( $\mu\text{L}$ )	Volumen x6 ( $\mu\text{L}$ )
$\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q	11.8	70.8
Green Buffer Flexi (5X)	5.0	30.0
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	1.5	9.0
Oligonucleótido 1* (5 $\mu\text{M}$ )	2.5	15.0
Oligonucleótido 2* (5 $\mu\text{M}$ )	2.5	15.0
dNTPs (10 mM)	0.5	3.0
GoTaq Flexi (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.2	1.2
DNA plasmídico**	1.0	-
Volumen total de reacción	25	

\*El par de oligonucleótidos empleado puede ser pGAPF y 3BGALGS, 5BGALGS y 3BGALGS, pGAPF y 3AOX, o 5BGALGS y 3AOX.

\*\*Las muestras empleadas se describan en el texto.

**Tabla 66.** Programa de termociclador para PCR con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS, 5BGALGS y 3BGALGS, pGAPF y 3AOX, y 5BGALGS y 3AOX.

No. de ciclos	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (min)
1	94	2:00
	94	0:30
30	52.5, 53, 55*	0:30
	72	5:00
1	72	10:00

\*52.5  $^{\circ}\text{C}$  para pGAPF y 3BGALGS, 53  $^{\circ}\text{C}$  para 5BGALGS y 3BGALGS, y 55  $^{\circ}\text{C}$  para pGAPF y 3AOX, y 5BGALGS y 3AOX. El termociclador cuenta con la opción de programar diferentes temperaturas en diferentes bloques de muestras en la misma corrida.



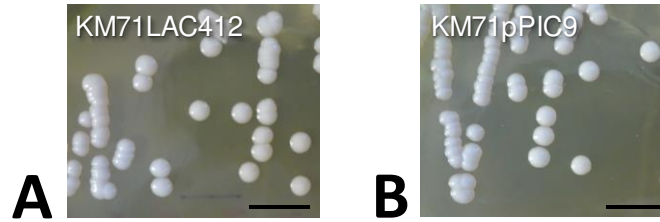
## 7. RESULTADOS

### 7.1. OBJETIVO 1. Evaluación del comportamiento metabólico y análisis de los perfiles transcripcionales de las cepas KM71LAC412 y una cepa control cultivadas en lactosa, glucosa, glicerol y lactosa con metanol.

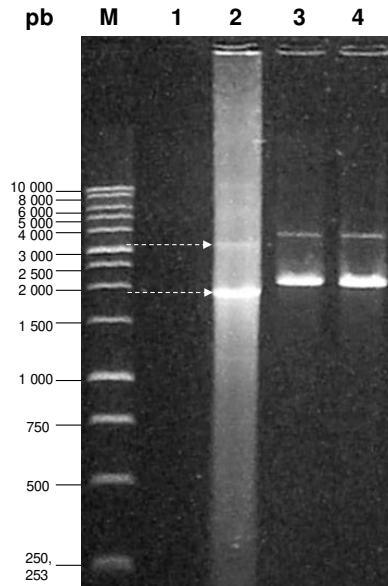
#### 7.1.1. Determinación de parámetros fisiológicos de la cepa KM71LAC412 y una cepa control en diferentes fuentes de carbono

##### 7.1.1.1. Determinación de velocidad de crecimiento específico, rendimiento de biomasa por unidad de sustrato y velocidad específica de consumo de sustrato

Para la evaluación del comportamiento metabólico, se realizaron cultivos de las cepas de *P. pastoris* KM71LAC412 y KM71pPIC9 en medio de sales basales suplementado con glucosa, glicerol o lactosa 30 mM (BMGlc, BMGly and BMLac, respectivamente), con el propósito de comparar la eficiencia del empleo de los sustratos entre las cepas. Los cultivos suplementados con lactosa no presentaron contaminación, lo cual se verificó mediante extensión en placas de agar YPD al finalizar el cultivo. La morfología colonial en las placas de YPD de KM71LAC412 fue idéntica a la mostrada por KM71pPIC9 (**Figura 17**). La identidad de la cepa KM71LAC412 en los cultivos en BMLac se verificó con PCR directo del paquete celular de las 24 h de cultivo empleando oligonucleótidos dirigidos a las regiones del promotor (pGAPF) y el terminador (3AOX) que flanquean a los genes *LAC4* y *LAC12* (**Figura 18**), los cuales caracterizan genéticamente a esta cepa. En el análisis por electroforesis del PCR directo de colonia de KM71LAC412 se esperaba la presencia de dos bandas, de 3310 y 1977 pb, correspondientes a la amplificación de las regiones entre el promotor y el terminador de *LAC4* y *LAC12*, respectivamente. Las dos bandas se encontraron en la electroforesis del análisis por PCR de las muestras, sin embargo, se observaron de un tamaño ligeramente superior a las del control positivo debido a que la pre-tinción del DNA en la electroforesis puede afectar la migración de las muestras, sin embargo, la presencia de las bandas de amplificación confirmó la identidad de la cepa KM71LAC412.



**Figura 17.** Morfología colonial de las cepas de *P. pastoris* KM71LAC412 (A) y KM71pPIC9 (B) en agar YPD. Estría en placa de cultivos en BMLac. La línea negra indica un tamaño de 1 cm.



**Figura 18.** Caracterización por PCR con oligonucleótidos pGAPF y 3AOX de la cepa KM71LAC412 de la primera cinética de crecimiento en BMLac mediante PCR de paquete celular. Se incluyen flechas como apoyo visual para la determinación del tamaño de las bandas (tamaños esperados: 3310 y 1977 pb). Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega). Carril 1: control negativo. Carril 2: control positivo (plásmido pGAP-LAC412). Carril 3: caracterización por PCR de paquete celular BMLac matraz 1 (24 h). Carril 4: caracterización por PCR de paquete celular BMLac matraz 2 (24 h).

Los valores estimados para la  $\mu$  de las cepas KM71LAC412 y de la cepa control KM71pPIC9 en las tres fuentes de carbono evaluadas, analizados mediante ANOVA unifactorial con prueba *post-hoc* Tukey, no mostraron diferencia significativa entre las dos cepas, y tampoco se encontró diferencia significativa al comparar los valores obtenidos en los cultivos en glucosa (BMGlc) y glicerol (BMGly) en cada cepa por separado (**Tabla 67**). El cálculo de las  $\mu$  de KM71LAC412 en BMLac se realizó en dos fases: la primera (1F) abarcó las primeras 12 h de la cinética de crecimiento y comprendió el crecimiento que se pudo deber a restos intracelulares del medio de cultivo del inóculo, y la segunda (2F), desde las 24 h hasta el inicio de la fase estacionaria. Este último valor se empleó en las comparaciones estadísticas contra el resto de las fuentes de carbono. La

cepa KM71LAC412 cultivada en BMLac obtuvo una  $\mu$  en la fase exponencial significativamente menor ( $0.012 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ ) a la de los cultivos en BMGlc y BMGly de esa misma cepa.

**Tabla 67.** Velocidad específica de crecimiento y rendimientos de biomasa/sustrato de las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9 en BMLac, BMGlc y BMGly.

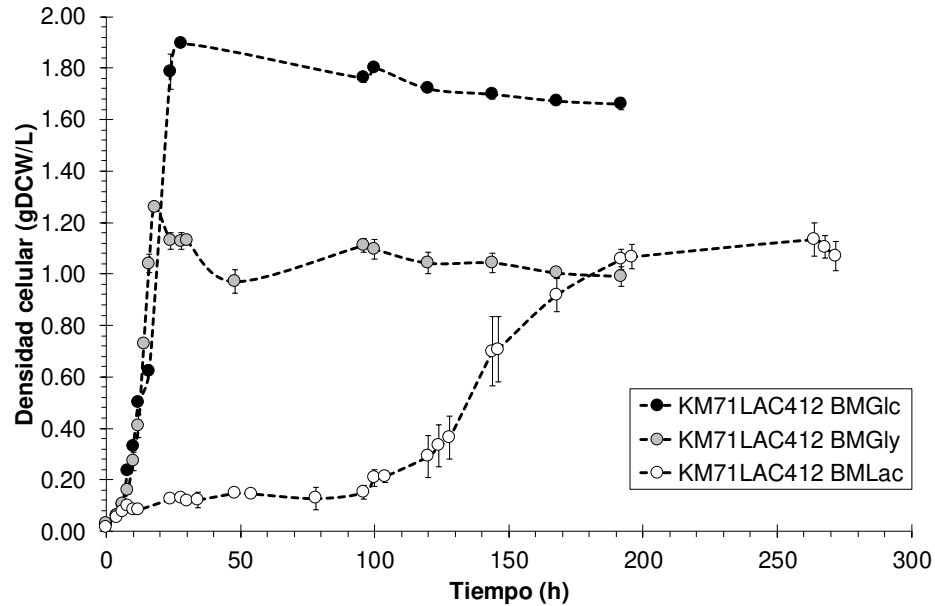
C	Medio	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$Y_{x/s}$ (gDCW/g)	$Y_{x/s}$ (gDCW/mol)	$Y_{x/s}$ (gDCW/molC)
KM71LAC412	BMLac	1F: $0.162 \pm 0.035^*$ 2F: $0.012 \pm 0.004^a$	$0.120 \pm 0.031^a$	$41.070 \pm 10.551^a$	$3.423 \pm 0.879^a$
	BMGlc	$0.304 \pm 0.013^b$	$0.365 \pm 0.025^b$	$65.798 \pm 4.594^b$	$10.966 \pm 0.766^b$
	BMGly	$0.288 \pm 0.057^b$	$0.439 \pm 0.043^b$	$40.429 \pm 3.991^a$	$13.476 \pm 1.330^b$
KM71pPIC9	BMLac	1F: $0.065 \pm 0.003$ 2F: $0.001 \pm 0.005^{**}$	$0.007 \pm 0.002^c$	$2.277 \pm 0.685^c$	$0.190 \pm 0.057^c$
	BMGlc	$0.293 \pm 0.004^b$	$0.355 \pm 0.039^b$	$63.892 \pm 7.032^b$	$10.649 \pm 1.172^b$
	BMGly	$0.292 \pm 0.072^b$	$0.435 \pm 0.107^b$	$40.096 \pm 9.835^a$	$13.365 \pm 3.278^b$

Los datos indican promedios ( $n \geq 2$ ) con desviaciones estándar. La estadística solo es comparable entre los datos de la misma columna. C: Cepa. molC: moles de carbono. 1F:  $\mu$  calculada de las 0 a las 12 h, no se consideró para la estadística comparativa con las otras fuentes de carbono debido a que corresponde a crecimiento con restos de medio del inóculo. 2F:  $\mu$  calculada de las 24 h hasta el inicio de la fase estacionaria. \*: Los datos de 1F y 2F son significativamente distintos entre las dos cepas. \*\*: El valor de  $\mu$  de 2F de KM71pPIC9 en BMLac no es comparable para la estadística, debido a que estos cultivos presentaron un crecimiento nulo después de las 12 h, sin embargo, sus  $Y_{x/s}$  son significativamente menores a los de KM71LAC412 en BMLac.

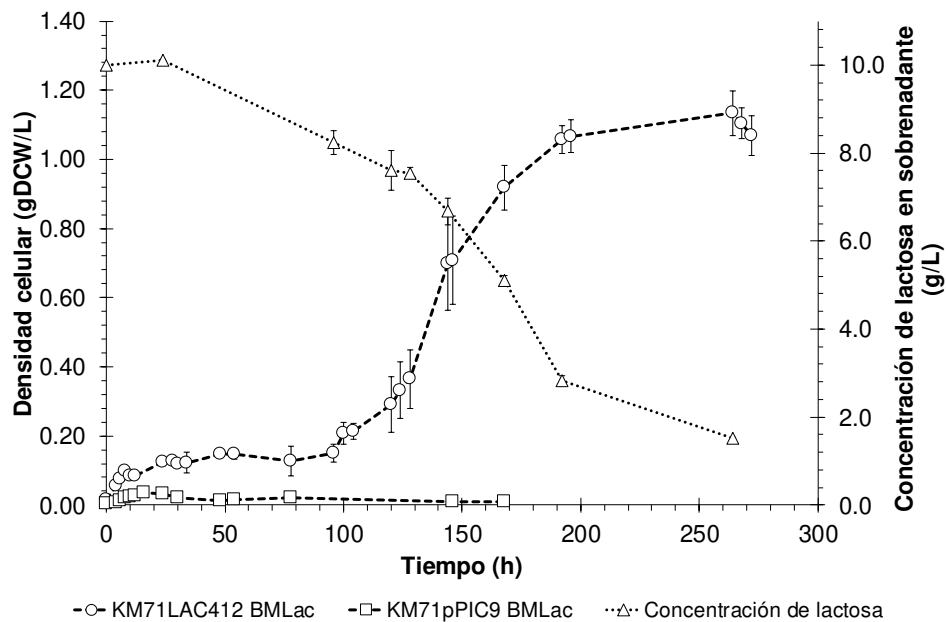
Para KM71pPIC9, la  $\mu$  también se calculó en dos fases: de las 0 a las 20 h, que abarcó el crecimiento exponencial, y de las 24 h hasta el final de la cinética, que correspondió a la fase estacionaria. Debido a que el crecimiento de KM71pPIC9 se detuvo tras las 20 h de cultivo, se consideró que este crecimiento se debió a restos intracelulares del medio de cultivo del inóculo y no al consumo de lactosa, por lo que el valor de  $\mu$  calculado no se empleó en las comparaciones estadísticas. En su lugar, se consideró un crecimiento nulo para KM71pPIC9 en BMLac, el cual difirió con el crecimiento observado en otras fuentes de carbono y con el de la cepa KM71LAC412. Esta diferencia además está sustentada por el  $Y_{x/s}$  significativamente menor de KM71pPIC9 en BMLac, como se describirá posteriormente.

El  $Y_{x/s}$  por gramo de sustrato en BMGlc y BMGly de las cepas KM71pPIC9 y KM71LAC412 no mostró diferencias significativas entre los cuatro valores, siendo de  $0.365 \pm 0.025$  y  $0.439 \pm 0.043$  gDCW/g respectivamente en KM71LAC412, y  $0.355 \pm 0.039$  y  $0.435 \pm 0.107$  gDCW/g respectivamente en KM71pPIC9. Sin embargo, los  $Y_{x/s}$  por mol de sustrato obtenidos en BMGlc fueron al menos 1.5 veces más altos que en BMGly ( $65.798 \pm 4.594$  contra  $40.429 \pm 3.991$  gDCW/mol en KM71LAC412,  $63.892 \pm 7.032$  contra  $40.096 \pm 9.835$  gDCW/mol en KM71pPIC9). Teóricamente, se esperaba que los cultivos de KM71LAC412 en BMLac mostraran  $Y_{x/s}$  por mol similares a los de los cultivos en BMGlc, ya que ambos se realizaron a concentraciones equimolares de sustrato y la lactosa tiene una unidad de glucosa por molécula. Sin embargo, el  $Y_{x/s}$  por mol de lactosa ( $41.070 \pm 10.551$  gDCW/mol) fue diferente al de glucosa ( $65.798 \pm 4.594$  gDCW/mol), y sin diferencia significativas con el obtenido en glicerol ( $40.429 \pm 3.991$  gDCW/mol).

El cultivo en BMLac de la cepa KM71LAC412 entró en la fase de crecimiento exponencial aproximadamente a las 96 h (empleando una  $DO_{600\text{ nm}}$  inicial de 0.1) y terminó esta fase aproximadamente a las 250 h. Este comportamiento contrastó con el de los cultivos de la cepa KM71LAC412 en BMGlc y BMGly, en los cuales la fase de crecimiento exponencial abarcó desde las 4 hasta las 24 h (**Figura 19**); y también difiere con el observado en la cepa control KM71pPIC9 en BMLac, que no mostró crecimiento después de las 16 h (**Figura 20**). El crecimiento observado de la cepa control KM71pPIC9, que no consume lactosa, en BMLac pudo deberse a restos del medio del inóculo dentro de las células, lo cual concuerda con los  $Y_{x/s}$  en BMLac de KM71LAC412, los cuales fueron al menos 3 veces mayores que los de la cepa control (**Tabla 67**). Estos resultados, aunados a la disminución en los niveles de sobrenadante en lactosa a lo largo del cultivo de la cepa KM71LAC412 en BMLac (**Figura 20**), indican que la cepa modificada KM71LAC412 metabolizó la lactosa y que su respuesta fisiológica en el cultivo con lactosa fue distinta en comparación con la presentada en los cultivos de glucosa y glicerol.



**Figura 19.** Cinética de crecimiento de *P. pastoris* KM71LAC412 cultivada en BMGlc, BMGly y BMLac. Datos obtenidos de a partir de  $n \geq 3$ , las barras de error muestran el error estándar.



**Figura 20.** Comparación de la densidad celular y el consumo de sustrato de *P. pastoris* KM71LAC412. Cinética de crecimiento de *P. pastoris* KM71LAC412 en BMLac contrastado con la concentración de lactosa en el sobrenadante en g/L. Se incluye la cinética de *P. pastoris* KM71pPIC9 en BMLac como control.

La velocidad de consumo específico de lactosa se calculó dividiendo la derivada del consumo de lactosa en el tiempo entre la biomasa. Los datos empleados en el cálculo se muestran en la **Tabla 68**. La velocidad de consumo específico de lactosa disminuyó a medida que aumentó el tiempo de cultivo, y el promedio de las velocidades de consumo

específico a partir de las 96 h, que es cuando comenzó a detectarse consumo de lactosa, y hasta las 264 h, fue de 0.260 mmol/gDCW h o 0.090 g/gDCW h.

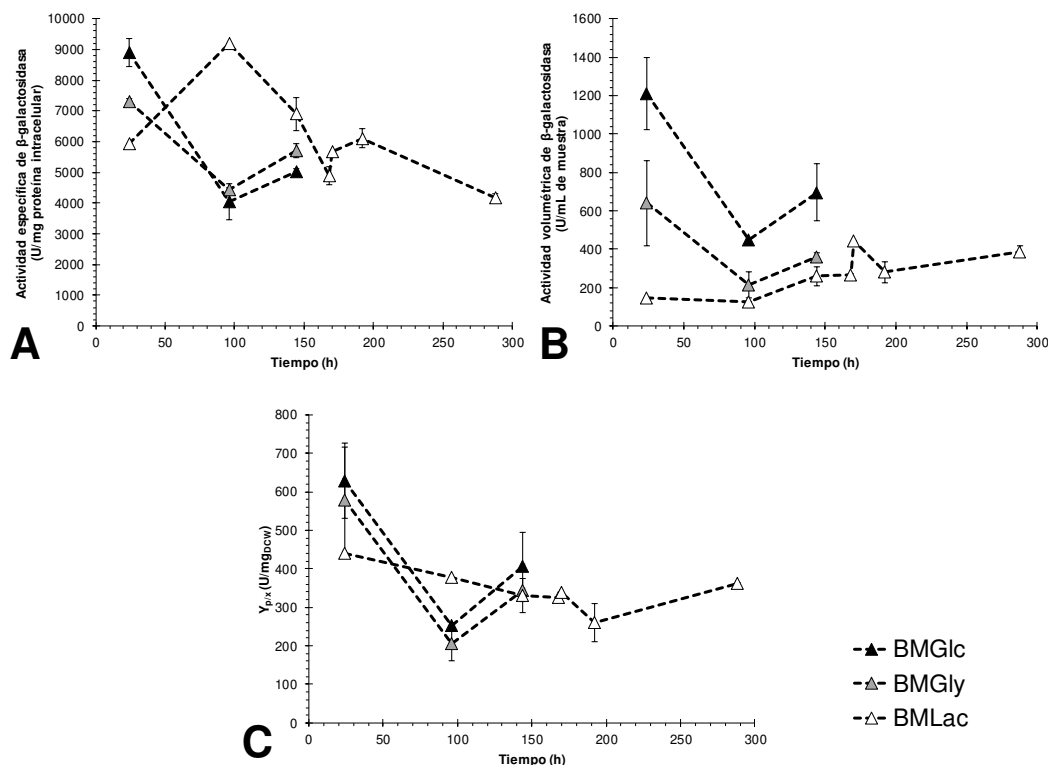
**Tabla 68.** Datos para el cálculo del consumo específico de lactosa de la cepa KM71LAC412 cultivada en BMLac

Tiempo (h)	Concentración de lactosa consumida		Velocidad de consumo		Densidad celular promedio gDCW/L	Velocidad específica de consumo	
	mM	g/L	mmol/h	g/h		mmol/gDCW h	g/gDCW h
0	0.000	0.000	<i>0.055</i>	<i>0.019</i>	0.016	<i>3.398</i>	<i>1.161</i>
24	0.000	0.000	<i>0.064</i>	<i>0.022</i>	0.124	<i>0.518</i>	<i>0.178</i>
96	5.290	1.811	0.093	0.032	0.151	0.618	0.213
120	7.180	2.458	0.103	0.036	0.291	0.353	0.122
128	7.354	2.517	0.106	0.037	0.365	0.290	0.100
144	9.969	3.413	0.112	0.039	0.699	0.161	0.056
168	14.713	5.036	0.122	0.042	0.918	0.133	0.046
192	21.519	7.366	0.132	0.046	1.057	0.124	0.043
264	25.416	8.700	0.160	0.056	1.134	0.141	0.049

Los datos en itálicas se incluyen como parte de los ajustes, a las 0 y 24 h no existió consumo de lactosa.

#### 7.1.1.2. Determinación de actividad específica de $\beta$ -galactosidasa

En la **Figura 21** y en la **Tabla 69** se muestran los datos de actividad específica, actividad volumétrica y rendimiento producto/biomasa de  $\beta$ -galactosidasa promedio de la cepa KM71LAC412 en distintos medios de cultivo a diferentes tiempos. La actividad específica de los lisados intracelulares de KM71LAC412, determinada en varios puntos de muestreo, disminuyó en los cultivos en las tres fuentes de carbono a tiempos largos. Para el cultivo en BMLac se observó un pico de actividad a las 96 h, con actividad comparable a la obtenida a las 24 h en BMGlc y BMGly. La actividad volumétrica, que indica la actividad enzimática por volumen de muestra, mostró una tendencia hacia un incremento gradual en BMLac, sin embargo, la actividad volumétrica en este medio de cultivo fue considerablemente menor a la obtenida en BMGlc y BMGly. En estos dos medios de cultivo, la actividad volumétrica fue mayor a las 24 h respecto a tiempos posteriores. El rendimiento de producto/biomasa ( $Y_{p/x}$ ) de  $\beta$ -galactosidasa se mantuvo relativamente constante a lo largo del cultivo en BMLac, sin embargo, en BMGlc y BMGly, el  $Y_{p/x}$  presentó cambios a lo largo del tiempo, obteniendo su mayor  $Y_{p/x}$  a las 24 h.



**Figura 21.** Actividad específica, actividad volumétrica y rendimiento producto/biomasa de  $\beta$ -galactosidasa promedio de la cepa KM71LAC412 en distintos medios de cultivo a diferentes tiempos. A) Actividad específica. B) Actividad volumétrica. C)  $Y_{p/x}$ . Las barras de error indican error estándar.

**Tabla 69.** Actividad específica, actividad volumétrica y rendimiento producto/biomasa de  $\beta$ -galactosidasa promedio de la cepa KM71LAC412 en distintos medios de cultivo a diferentes tiempos.

Medio de cultivo	Tiempo (h)	n	Actividad específica (U/mg)	Actividad volumétrica (U/mL)	$Y_{p/x}$ (U/mgDCW)
BMLac	24*	1	5929.56	144.42	439.11
	96	1	9204.53	127.75	377.84
	144	2	6901.9 $\pm$ 530.32	260.6 $\pm$ 49.63	330.69 $\pm$ 43.71
	168	2	4895.75 $\pm$ 290.65	266.51 $\pm$ 6.35	324.25 $\pm$ 3.61
	170*	1	5660.06	446.31	338.06
	192	3	6101.99 $\pm$ 310.14	280.22 $\pm$ 56.87	260.32 $\pm$ 48.68
	288	2	4173.04 $\pm$ 140.17	388.17 $\pm$ 29.78	361.19 $\pm$ 2.97
BMGlc	24	3	8908.23 $\pm$ 456.22	1209.98 $\pm$ 187.97	628.93 $\pm$ 97.38
	96	2	4054.6 $\pm$ 589.78	447.82 $\pm$ 12.96	251.58 $\pm$ 7.93
	144	2	5007.57 $\pm$ 121.76	695.04 $\pm$ 148.19	405.8 $\pm$ 89.63
BMGly	24	3	7313.72 $\pm$ 98.66	639.62 $\pm$ 220.6	577.12 $\pm$ 140.09
	96	2	4444.76 $\pm$ 41.14	214.81 $\pm$ 69.43	206.32 $\pm$ 43.84
	144	2	5699.71 $\pm$ 222.86	362.36 $\pm$ 19.33	342.95 $\pm$ 1.49

Los datos indican promedio y desviación estándar, excepto en los casos en los que n = 1. n: Número de muestras procesadas. \*: Datos de cinéticas de crecimiento distintas a las del resto de los datos. U: unidades enzimáticas (definidas como catálisis de 1 nmol de ONPG/min de acuerdo con el protocolo empleado).

## 7.1.2. Análisis de transcriptoma de las cepas KM71LAC412 y una cepa control en diferentes fuentes de carbono

### 7.1.2.1. Medición de parámetros fisiológicos de los cultivos empleados para la toma de muestra

Los valores de  $DO_{600\text{ nm}}$  al tiempo de muestreo (30 h) de los cultivos empleados para el análisis de transcriptoma (**Tabla 70**) resultaron ser similares para las dos cepas cultivadas en BMGlc, y ~2.6 veces menores en el cultivo de la cepa KM71LAC412 en BMLac comparada con el cultivo de la misma en BMGlc. A pesar de que los cultivos fueron realizados de la misma forma que los empleados para la determinación de los parámetros fisiológicos con las cinéticas de crecimiento, el valor de  $DO_{600\text{ nm}}$  del cultivo de la cepa KM71LAC412 en BMLac para el transcriptoma a las 30 h fue mayor que el obtenido en los cultivos empleados en las cinéticas de crecimiento de la cepa KM71LAC412 en BMLac (**Tabla 70**). Los cultivos realizados para la toma de muestras de las que se obtuvieron los transcriptomas fueron distintos a los que se emplearon para el análisis de la cinética de crecimiento. En los cultivos de los que derivaron las muestras para los transcriptomas solamente se tomó la medición de  $DO_{600\text{ nm}}$  a las 30 h, que fue el tiempo al que se recolectaron las células, aunque no se registró el valor de  $DO_{600\text{ nm}}$  de la cepa KM71LAC412 cultivada en BMLacMet.

**Tabla 70.** Densidad óptica a las 30 h de los cultivos empleados en la obtención de la muestra para RNA-Seq.

Cepa de <i>P. pastoris</i>	Medio de cultivo	$DO_{600\text{ nm}}$	
		Cultivos para RNA-Seq*	Cultivos para cinéticas
KM71LAC412	BMLac	$3.1 \pm 0.12$	$1.63 \pm 0.50$
KM71LAC412	BMGlc	$8.2 \pm 0.15$	$8.04 \pm 0.55^{**}$
KM71pPIC9	BMGlc	$8.3 \pm 0.09$	$7.81 \pm 0.85^{**}$

\*Los datos se obtuvieron de cultivos por triplicado.

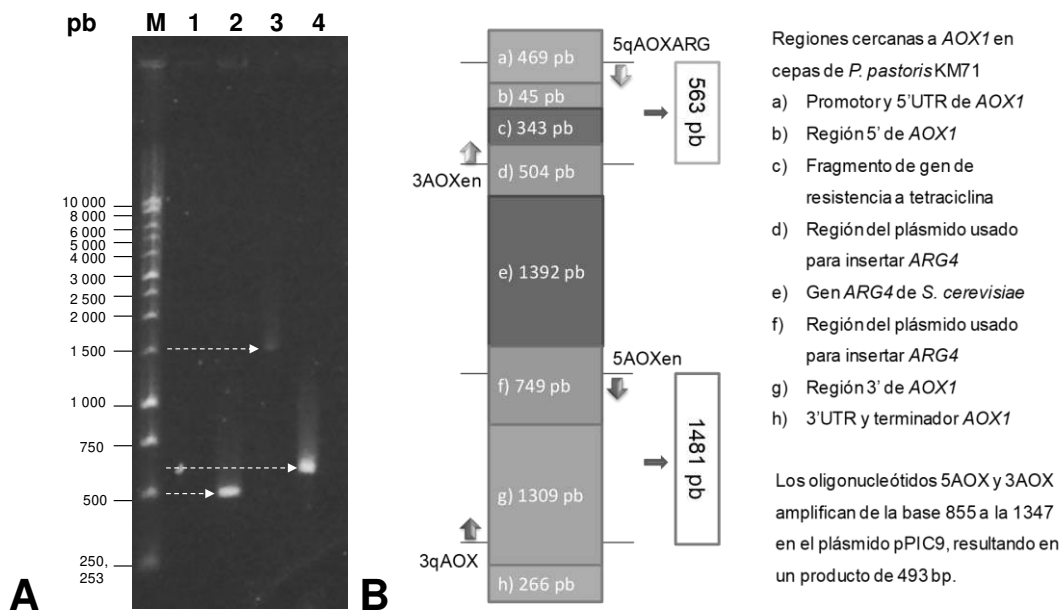
\*\*Las cinéticas en BMGlc se detuvieron antes de las 30 h debido a que los cultivos entraron en fase estacionaria antes de ese tiempo, los datos mostrados corresponden a las 24 h.

### 7.1.2.2. Validación de archivos y modificación de la anotación de referencia

Los archivos FASTQ con las lecturas de RNA-Seq provenientes de la secuenciación de las muestras de cultivo de *P. pastoris* KM71LAC412 en BMGlc, BMLac y BMLacMet y de KM71pPIC9 en BMGlc se procesaron como se indicó en el apartado **6.2.3.4**. Cabe destacar que los archivos del genoma de referencia y de sus respectivas anotaciones



empleados para procesar los archivos FASTQ de los transcriptomas se modificaron para incluir los plásmidos que se usaron para transformar las cepas de *P. pastoris* KM71LAC412 y KM71pPIC9, así como la región *aox1::ARG4* de la cepa KM71, la cual se encuentra en el **Anexo 2**. La verificación del tamaño de la región *aox1::ARG4* a partir de las PCR con oligonucleótidos dirigidos a secuencias específicas para las cepas KM71 (descrita en **6.2.3.4.2**) mostró que las amplificaciones coincidieron con los tamaños esperados de 563 (5qAOX1ARG4 y 3AOXen), 1481 (5AOXen y 3qAOX) y 493 pb (5AOX y 3AOX) (**Figura 22**), validando así el tamaño de la región *aox1::ARG4*.

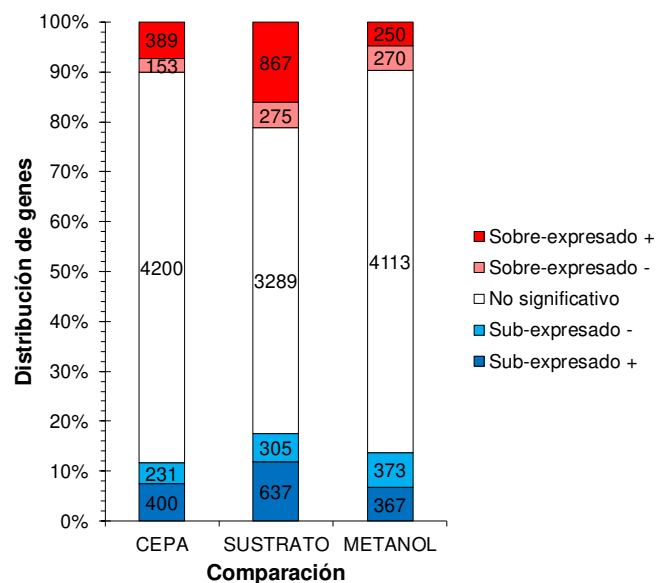


**Figura 22.** Verificación por PCR de la región *aox1::ARG4* de *P. pastoris* KM71. Se incluyen flechas como apoyo visual para la determinación del tamaño de las bandas. A) PCR de colonia de cepa de *P. pastoris* KM71pPIC9. Carril M: Marcador 1 kb Ladder (Promega). Carril 1: Control negativo (oligonucleótidos 5AOX y 3AOX). Carril 2: Control positivo (oligonucleótidos 5AOX y 3AOX), tamaño esperado: 493 pb (amplificación en región del plásmido pPIC9). Carril 3: Amplificación con oligonucleótidos 5AOXen y 3qAOX, tamaño esperado: 1481 pb. Carril 4: Amplificación con oligonucleótidos 5qAOX1ARG4 y 3AOXen, tamaño esperado: 563 pb. B) Esquema de las regiones de *aox1::ARG4*, indicando las regiones de hibridación de los oligonucleótidos empleados.

### 7.1.2.3. Comparación de la expresión diferencial de genes entre cepas y fuentes de carbono

Los transcriptomas de los cultivos a 30 h de las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9 cultivadas en BMGlc, y de la cepa KM71LAC412 en BMLac y BMLacMet, se emplearon para el análisis de la expresión diferencial de genes. Se realizaron tres comparaciones: entre las dos cepas cultivadas en BMGlc (comparación CEPA), entre los cultivos en

BMLac y BMGlc de la cepa KM71LAC412 (comparación SUSTRATO), y entre los cultivos en BMLac y BMLacMet de la cepa KM71LAC412 (comparación METANOL). El análisis de la expresión diferencial mostró cambios en el perfil transcripcional en las tres comparaciones realizadas. La **Figura 23** muestra el porcentaje de genes con expresión diferencial en las comparaciones CEPA, SUSTRATO y METANOL, considerando con expresión diferencial a aquellos con un valor p ajustado (q) menor a 0.05, y destacando entre éstos a los que además de tener un valor q menor a 0.05 presentaron un  $\log_2$  del *fold change* mayor a 1 o menor a -1 (marcados con “+”). En todas las comparaciones, existió un cambio en la expresión de al menos 22 % de los 5373 genes mapeados. Fue notable la respuesta de la comparación SUSTRATO en contraste con las otras dos comparaciones, debido a que casi 40 % de los transcritos en BMLac presentaron una expresión diferencial con respecto al cultivo en BMGlc. Esto indica un gran impacto de la fuente de carbono por encima del efecto de la integración de los genes *LAC* al genoma o de la adición de metanol al medio de cultivo, ya que las comparaciones CEPA y METANOL contaron con alrededor del 22 y 23.5 % de sus transcritos con expresión diferencial, respectivamente.



**Figura 23.** Análisis de la expresión diferencial de las tres comparaciones. Las barras muestran el porcentaje de genes con expresión diferencial para cada comparación., los números dentro de las barras indican la cantidad total de genes en cada categoría. Se incluyen 3 comparaciones: GLC-pPIC9/GLC-LAC412 (referida como CEPA), GLC-LAC412/LAC-LAC412 (referida como sustrato) y LACMET-LAC412/ LAC-LAC412 (referida como metanol). La sobre o sub-expresión se refiere al segundo miembro del par de cada comparación (por ejemplo, los genes sobre-expresados en la comparación CEPA son los de GLC-LAC412 respecto a los de GLC-pPIC9). Las categorías marcadas con “+” incluyen genes sobre o sub-expresados estadísticamente significativos con un  $\log_2$  del *fold change* mayor a 1 o menor que -1, las categorías “-“ incluyen el resto de los genes sobre o sub-expresados estadísticamente significativos.

Para identificar y clasificar la función de los genes expresados diferencialmente en las comparaciones realizadas, se realizó un análisis en ClueGO, en donde se utilizaron los parámetros por defecto, seleccionando a *P. pastoris* como organismo, las tres bases de datos de ontología de genes, y seleccionando como extra la opción GO Term Fusion.

Los términos GO sobrerrepresentados que resultaron significativos (Term PValue Corrected with Bonferroni step down  $\leq 0.05$ ) entre los genes expresados diferencialmente de las tres comparaciones, después de eliminar los términos GO redundantes, se enlistan en la **Tabla 71**. Se observó una mayor cantidad y diversidad de términos sobrerrepresentados en la comparación SISTRATO en comparación con la de CEPAS y METANOL. En la comparación CEPAS se sobre-expresaron genes de transporte transmembranal y se sub-expresaron genes del peroxisoma. Entre los genes sobre-expresados en la comparación de SISTRATO se presenta una marcada tendencia a procesos involucrados con el metabolismo y síntesis de proteínas, así como unión a RNA, y entre los sub-expresados se encuentran varios procesos metabólicos de compuestos. Cabe destacar que el término GO de expresión de genes (ID:0010467) se encuentra significativamente sobrerrepresentado entre los genes sobre- y sub- expresados en la comparación SISTRATO, con el 31.3 % de los genes incluidos en este término sobre-expresados y el 10.52 % sub-expresados, es decir, con 41.8 % de los genes con expresión diferencial dentro de este término. En la comparación METANOL, se sobre-expresaron genes relacionados con la síntesis de ribosoma, la replicación de DNA y el transporte transmembrana, mientras que se sub-expresaron los de procesos de proteasoma.

**Tabla 71.** Términos GO sobrerrepresentados entre los genes expresados diferencialmente de las comparaciones.

C	Estado	GO Term ID	BD	Descripción del término de ontología de genes	#	%
CEPA	↑	0043412	B	Modificación de macromolécula	24	5.44
		0055085	B	Transporte transmembranal	56	20.00
		0006464	B	Proceso de modificación de proteínas celulares	22	5.76
		0009205	B	Proceso metabólico de purina ribonucleósido trifosfato	15	32.61
	↓	0005777	C	Peroxisoma	13	46.43
		0043232	C	Organelo intracelular no unido a membrana	34	6.19
		0043170	B	Proceso metabólico de macromolécula	116	8.59
		0044439	C	Parte del peroxisoma	9	56.25
		0044242	B	Proceso catabólico de lípido celular	7	70.00

	0044260	B	Proceso metabólico de macromolécula celular	92	8.30	
	0034645	B	Proceso biosintético de macromolécula celular	52	7.43	
	0010467	B	Expresión de genes	63	7.80	
<b>SUSTRATO</b>	↑	1901564	B	Proceso metabólico de compuesto organonitrogenado	438	40.90
		1901576	B	Proceso biosintético de sustancia orgánica	393	39.62
		0005737	C	Citoplasma	502	36.17
		0043603	B	Proceso metabólico de amida celular	165	55.56
		0044444	C	Parte del citoplasma	458	36.18
		0005840	C	Ribosoma	112	63.64
		0044267	B	Proceso metabólico de proteína celular	271	39.22
		0016021	C	Componente integral de membrana	127	13.80
		0031224	C	Componente intrínseco de membrana	130	14.05
		0019538	B	Proceso metabólico de proteína	289	37.83
		0044424	C	Parte intracelular	601	30.87
		1901605	B	Proceso metabólico de alfa-aminoácido	64	67.37
		0005622	C	Intracelular	609	30.42
		0000502	C	Complejo de proteasoma	33	76.74
		0044445	C	Parte del citosol	32	76.19
		0034641	B	Proceso metabólico de compuesto nitrogenado de la célula	361	32.15
		0044272	B	Proceso biosintético de compuesto de azufre	26	74.29
		0006790	B	Proceso metabólico de compuesto de azufre	40	59.70
		0010498	B	Proceso catabólico de proteína del proteasoma	33	64.71
		0000166	M	Unión a nucleótido	198	35.23
		0043168	M	Unión de anión	208	34.44
		1901135	B	Proceso metabólico derivado de carbohidratos	78	42.86
		0004298	M	Actividad de endopeptidasa tipo-treonina	13	92.86
		0017144	B	Proceso metabólico de droga	49	47.57
		0019693	B	Proceso metabólico de ribosa fosfato	39	50.65
		0072521	B	Proceso metabólico de compuesto que contiene purina	39	50.65
		0008135	M	Unión a RNA, actividad de factor de traducción	29	56.86
		0044260	B	Proceso metabólico de macromolécula celular	335	30.21
		0010467	B	Expresión de genes	254	31.44
		0003723	M	Unión a RNA	95	37.85
		0072522	B	Proceso biosintético de compuesto que contiene purina	22	61.11
		0004812	M	Actividad de aminoacil-tRNA ligasa	21	58.33
		0072527	B	Proceso metabólico de compuesto que contiene pirimidina	14	70.00
		0006450	B	Regulación de la fidelidad de la traducción	12	75.00
		0006413	B	Inicio de la traducción	23	53.49
		0050662	M	Unión a coenzima	48	41.38
0002161	M	Actividad de edición de aminoacil-tRNA	8	88.89		
	0005622	C	Intracelular	259	12.94	
	0044424	C	Parte intracelular	252	12.94	
	0016021	C	Componente integral de membrana	258	28.04	
	↓	1901566	B	Proceso biosintético de compuesto organonitrogenado	33	6.41
		0043229	C	Organelo intracelular	221	12.98
		0034641	B	Proceso metabólico de compuesto celular nitrogenado	130	11.58
	0044428	C	Parte nuclear	30	6.90	

	0044267	B	Proceso metabólico de proteína celular	67	9.70	
	0010467	B	Expresión de genes	85	10.52	
	0043603	B	Proceso metabólico de amida celular	16	5.39	
	0005737	C	Citoplasma	182	13.11	
	0043170	B	Proceso metabólico de macromolécula	176	13.04	
	1901576	B	Proceso biosintético de sustancia orgánica	120	12.10	
	0019538	B	Proceso metabólico de proteína	86	11.26	
	0055085	B	Transporte transmembrana	90	32.14	
	0006396	B	Procesamiento de RNA	12	5.45	
	0044444	C	Parte de citoplasma	170	13.43	
	1901564	B	Proceso metabólico de compuesto organonitrogenado	140	13.07	
	0044260	B	Proceso metabólico de macromolécula celular	149	13.44	
	0006139	B	Proceso metabólico de compuesto que contiene nucleobase	106	12.59	
	0003723	M	Unión a RNA	19	7.57	
	0006725	B	Proceso metabólico de compuesto aromático celular	117	12.96	
	0043933	B	Organización de subunidad de complejo macromolecular	13	6.47	
	0022402	B	Proceso del ciclo celular	8	5.13	
	1901360	B	Proceso metabólico de compuesto orgánico cíclico	128	13.57	
	0046483	B	Proceso metabólico de heterociclo	124	13.58	
	0034470	B	Procesamiento de ncRNA	8	5.63	
METANOL	0005730	C	Nucléolo	38	31.15	
	0042254	B	Biogénesis de ribosoma	38	30.89	
	0030684	C	Prerribosoma	21	40.38	
	0005737	C	Citoplasma	99	7.13	
	0044444	C	Parte de citoplasma	88	6.95	
	0044267	B	Proceso metabólico de proteína celular	37	5.35	
	0019538	B	Proceso metabólico de proteína	44	5.76	
	1901564	B	Proceso metabólico de compuesto organonitrogenado	75	7.00	
	0030687	C	Prerribosoma, precursor de la subunidad grande	10	55.56	
	0008509	M	Actividad de transportador transmembrana de anión	16	36.36	
	0003333	B	Transporte transmembrana de aminoácido	11	47.83	
	0055085	B	Transporte transmembrana	54	19.29	
	0016072	B	Proceso metabólico de rRNA	25	25.77	
	0005739	C	Mitocondria	14	4.28	
	0006270	B	Inicio de replicación de DNA	8	53.33	
	0031224	C	Componente intrínseco de membrana	132	14.27	
	1901566	B	Proceso biosintético de compuesto organonitrogenado	31	6.02	
	0017116	M	Actividad de DNA helicasa dependiente de DNA de cadena sencilla y dependiente de ATP	4	100.00	
		0000502	C	Complejo de proteasoma	33	76.74
		1901575	B	Proceso catabólico de sustancia orgánica	92	37.25
	0005829	C	Citosol	144	27.91	
	0006508	B	Proteólisis	64	35.56	
	1901564	B	Proceso metabólico de compuesto organonitrogenado	237	22.13	
	0004298	M	Actividad de endopeptidasa tipo treonina	13	92.86	
	0006732	B	Proceso metabólico de coenzima	35	42.17	

0006090	B	Proceso metabólico de piruvato	15	71.43
0090304	B	Proceso metabólico de ácido nucleico	67	9.33
0005737	C	Citoplasma	279	20.10
0009132	B	Proceso metabólico de nucleósido difosfato	14	70.00
0031224	C	Componente intrínseco de membrana	97	10.49
0072524	B	Proceso metabólico de compuesto que contiene piridina	20	52.63
0051186	B	Proceso metabólico de cofactor	42	34.71
0055086	B	Proceso metabólico de molécula pequeña que contiene nucleobase	43	33.86
0017144	B	Proceso metabólico de droga	37	35.92
0005832	C	Complejo-T que contiene chaperonina	8	100.00
0044444	C	Parte del citoplasma	254	20.06
0005975	B	Proceso metabólico de carbohidrato	36	34.62
0003676	M	Unión a ácido nucleico	56	9.61
0003677	M	Unión a DNA	15	6.17
0044272	B	Proceso biosintético de compuesto de azufre	17	48.57
0010467	B	Expresión de gen	88	10.89
0010499	B	Proceso catabólico de proteínas proteasómico independiente de ubiquitina	7	87.50
0044262	B	Proceso metabólico de carbohidrato celular	21	40.38
0044428	C	Parte nuclear	40	9.20
0035966	B	Respuesta a proteína topológicamente incorrecta	9	64.29
0006793	B	Proceso metabólico de fósforo	96	22.80
0034470	B	Procesamiento de ncRNA	7	4.93
0019637	B	Proceso metabólico de organofosfato	51	26.70

C: Comparación

↑: Términos sobrerrepresentados entre los genes sobre-expresados.

↓: Términos sobrerrepresentados entre los genes sub-expresados.

BD: Base de datos. B: GO\_BiologicalProcess-Custom\_28.01.2018\_00h00 C: GO\_CellularComponent-Custom\_28.01.2018\_00h00 M: GO\_MolecularFunction-Custom\_28.01.2018\_00h00

#: Número de genes del término entre los genes sobre o sub-expresados en cada comparación.

#: Porcentaje de genes del término entre los genes sobre o sub-expresados en cada comparación.

Los análisis en ClueGO se realizaron con los parámetros por defecto, seleccionando a *P. pastoris* como organismo y las tres bases de datos mencionadas, seleccionando como extra la opción GO Term Fusion.

Los términos mostrados en la tabla corresponden a los que resultaron significativos (Term PValue

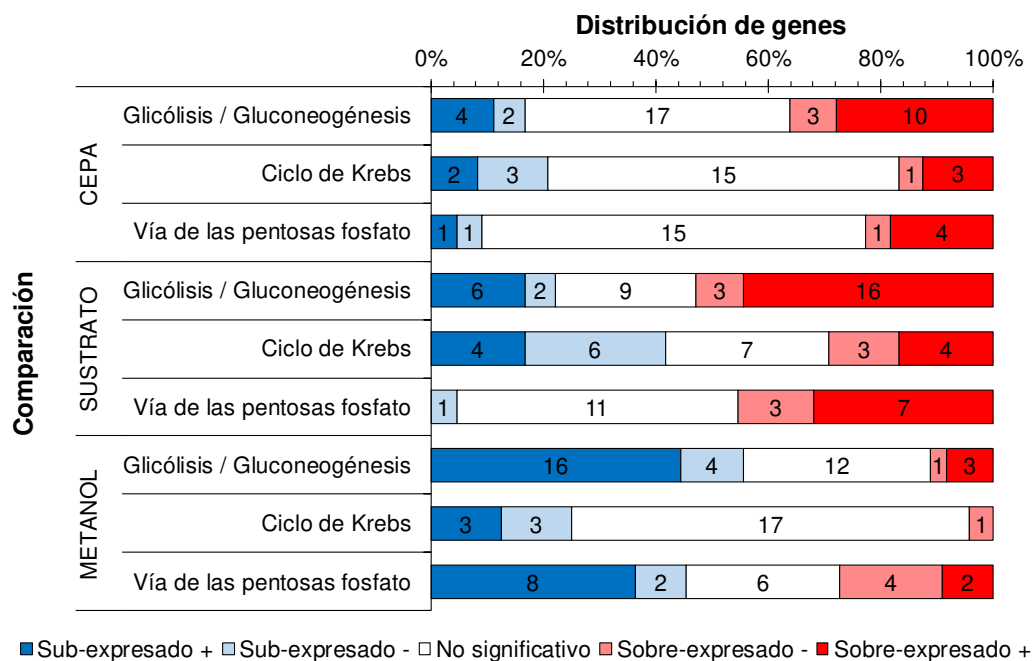
Corrected with Bonferroni step down  $\leq 0.05$ ). Los términos significativos de las comparaciones

SUSTRATO y METANOL se introdujeron en la herramienta REVIGO (<http://revigo.irb.hr>) para eliminar los términos redundantes, empleando los parámetros por defecto, excepto la opción de Allowed similarity la cual se modificó a Small (0.05).

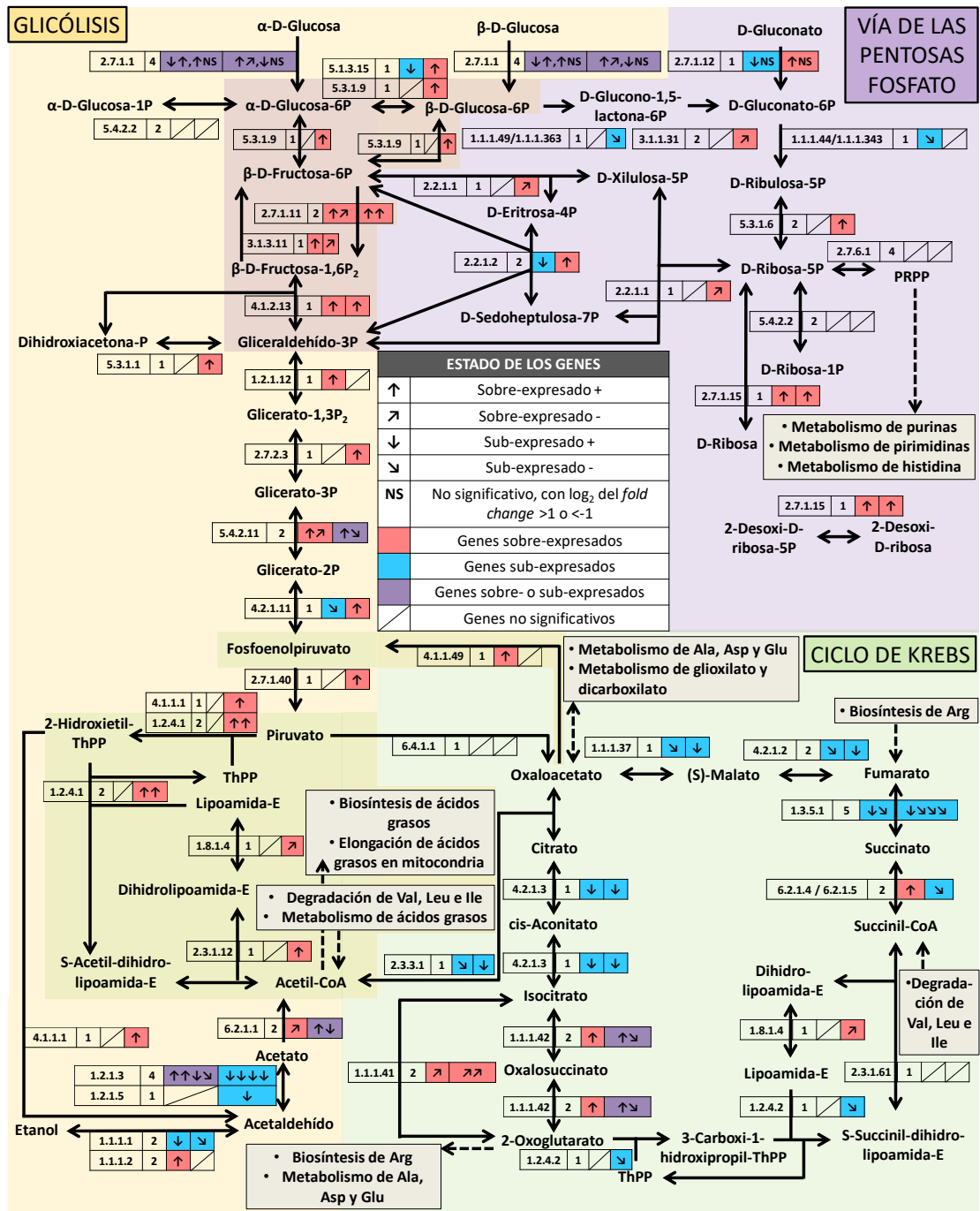
### 7.1.2.3.1. Regulación de las vías del metabolismo central

En las tres comparaciones de los transcriptomas previamente mencionadas se analizaron los genes de las principales vías del metabolismo central: glucólisis (y gluconeogénesis), ciclo de Krebs y vía de las pentosas fosfato; debido a que las modificaciones genéticas de la cepa KM71LAC412 se realizaron con el fin de que pudiese consumir una fuente de carbono que no metaboliza de forma natural, por lo que esto probablemente afectaría la expresión de dichos genes. El estado de las principales vías metabólicas en las comparaciones (**Figura 24**), mostró una sobre-expresión de más del

45 % de los genes relacionados con glicólisis/gluconeogénesis y vía de las pentosas fosfato en la comparación SUSTRATO, que puede indicar un flujo metabólico en ambas rutas más activo en BMLac. Existió una disminución general en los niveles transcripcionales de cerca del 40 % de los genes del ciclo de Krebs en esa misma comparación. De igual forma, en la comparación METANOL existió sub-expresión en más del 45 % de los genes de glicólisis/gluconeogénesis y vía de las pentosas fosfato. La sub-expresión de los genes de glicólisis/gluconeogénesis concuerda con el análisis de los genes del metabolismo de metanol (descrito en el apartado 7.1.2.3.3). La comparación CEPAS no presentó tendencias de sobre o sub-expresión tan definidas como las de las otras dos comparaciones. Un análisis específico del estado de los genes que codifican enzimas de estas rutas, en las comparaciones CEPA y SUSTRATO, se presenta en la **Figura 25**, para que de esta manera se pueda observar el estado de expresión de los genes de las enzimas relacionadas con intermediarios metabólicos de interés.



**Figura 24.** Expresión diferencial de las rutas del metabolismo central. Los números muestran la cantidad de genes con expresión diferencial, las barras muestran el porcentaje de genes de la ruta. Para la explicación de las comparaciones y el estado de expresión de los genes, ver la **Figura 23**.

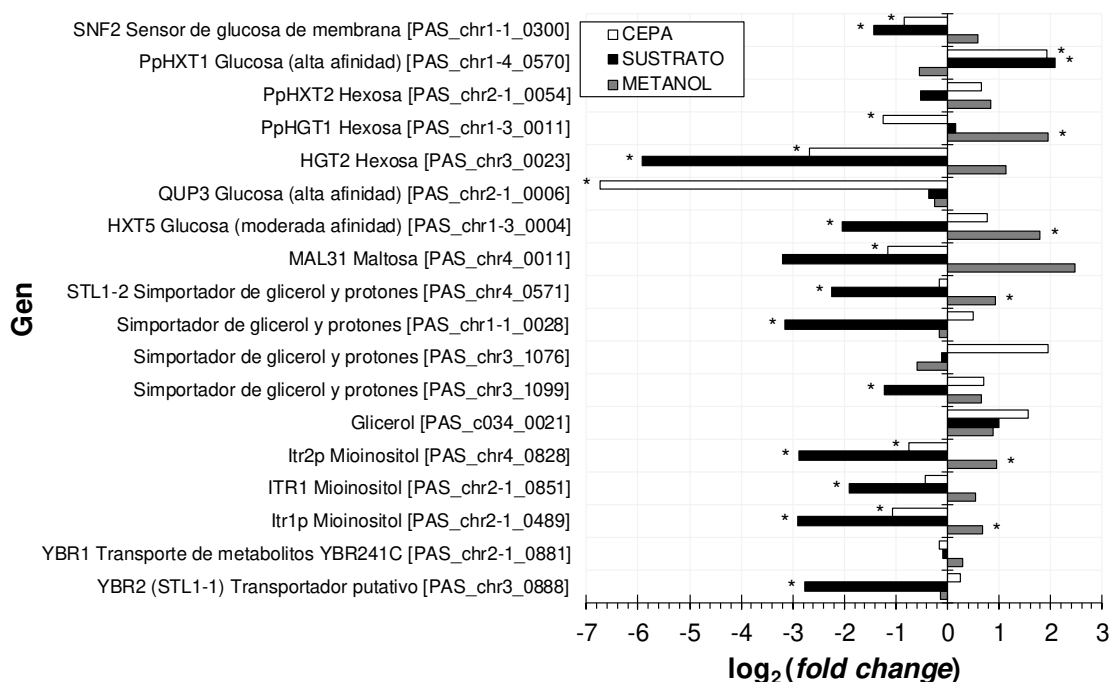


**Figura 25.** Estado de los genes relacionados con el metabolismo central. Las flechas que unen compuestos representan reacciones enzimáticas, las cajas más cercanas a o que están sobre una flecha contienen los siguientes datos (de izquierda a derecha): número EC de la enzima que cataliza la reacción, número de genes codificantes para esa enzima, estado de la regulación en la comparación CEPA, estado de la regulación en la comparación SUSTRATO. Cada flecha en las cajas representa un solo gen. Cada color de fondo representa una ruta metabólica diferente: naranja para glicólisis, verde para el ciclo de Krebs, morado para la vía de las pentosas fosfato, el traslape de los colores de fondo indican reacciones involucradas en dos rutas metabólicas de acuerdo con KEGG. Figura realizada a partir de los datos disponibles de *P. pastoris* (*K. phaffii*) en KEGG. Para la explicación de las comparaciones y el estado de expresión de los genes, ver la **Figura 23**.



### 7.1.2.3.2. Estado de los transportadores de carbohidratos

Los resultados de la expresión de los transportadores de carbohidratos para las tres comparaciones en el análisis de transcriptoma (**Figura 26**) mostraron una marcada sub-expresión de los transportadores de carbohidratos en la comparación SUSTRATO y sobre-expresión en la comparación METANOL, lo cual significa que los genes de transportadores de carbohidratos tuvieron una menor expresión en el cultivo de KM71LAC412 en BMLac comparado con los cultivos de la misma cepa en BMGlc y BMLacMet. El único gen que presentó sobre-expresión significativa en las comparaciones CEPA y SUSTRATO fue un transportador de glucosa de alta afinidad (*PpHXT1*).



**Figura 26.** Estado de expresión de los genes de transportadores de carbohidratos en las comparaciones CEPA, SUSTRATO y METANOL. \*: Significativo.

Debido a que el patrón de expresión de *PpHXT1* fue distinto al de la mayoría de los transportadores restantes, y a que se considera que el promotor de este gen tiene potencial para la producción de proteínas recombinantes (Prielhofer et al. 2013), se analizó por separado su nivel de expresión en FPKM (**Tabla 72**). Su expresión fue aproximadamente 4 veces mayor en BMLac que en BMGlc. También se incluyeron como comparación los datos de los transportadores de hexosa/glucosa *PpHXT2* y *PpHGT*, este último igualmente considerado como un promotor con potencial para la producción de proteínas

recombinantes (Prielhofer et al. 2013). El gen *PpHXT1* presentó sobre-expresión significativa en las comparaciones CEPA y SUSTRATO, mientras que el gen *PpHGT1* se sub-expresó en la comparación CEPA y se sobre-expresó en la comparación METANOL. No existió expresión diferencial significativa del gen *PpHXT2* en las tres comparaciones.

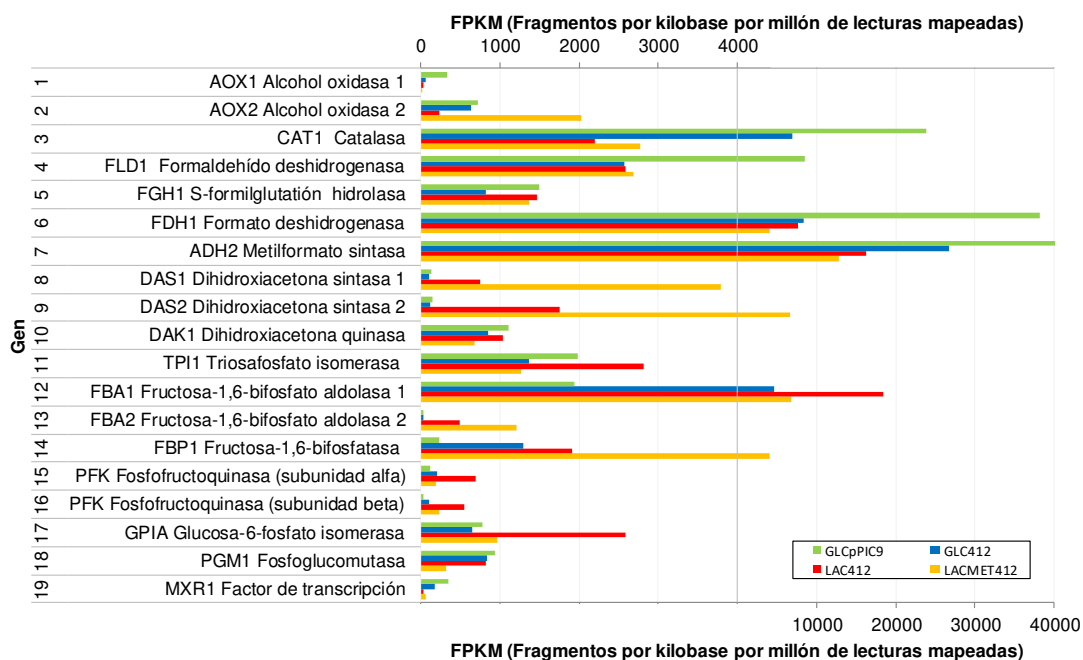
**Tabla 72.** Niveles de expresión y expresión diferencial de genes de transportadores PpHXT1, PpHXT2 y PpHGT1 en los análisis de transcriptoma.

	FPKM GLC- pPIC9	FPKM GLC- LAC412	FPKM LAC- LAC412	FPKM LACMET- LAC412	log <sub>2</sub> fold change CEPA	log <sub>2</sub> fold change SUSTRATO	log <sub>2</sub> fold change METANOL
<i>PpHXT1</i>	1175.89	4467.60	18978.50	12947.20	1.9258*	2.0868*	-0.5517
<i>PpHXT2</i>	16.72	26.37	18.28	32.96	0.6567	-0.5283	0.8505
<i>PpHGT1</i>	1203.77	510.186	570.25	2202.99	-1.2385*	0.1606	1.9498*

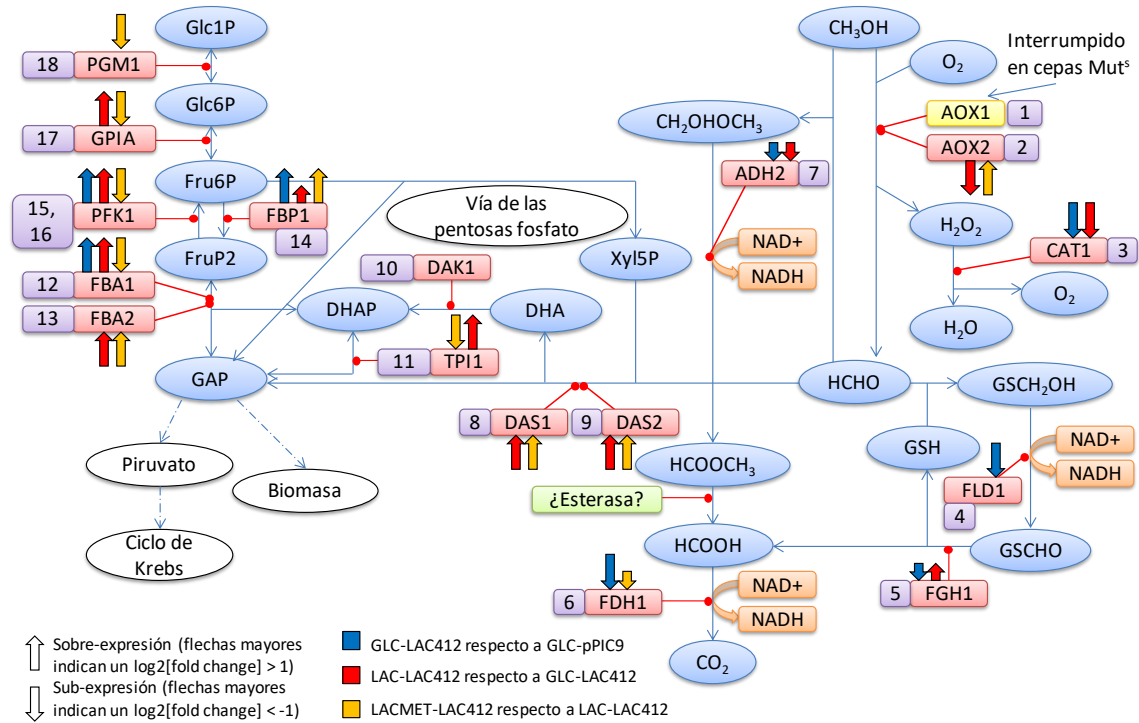
\*: Significativo ( $q \leq 0.05$ ). FPKM: Fragmentos por kilobase por millón de lecturas mapeadas.

### 7.1.2.3.3. Estado de los genes del metabolismo de metanol

El análisis de la expresión diferencial de genes de metabolismo de metanol indicó que los genes *TP11*, *PFK1*, *FBA1*, *GPIA* y *PGM1* se sub-expresaron y *AOX2*, *DAS1*, *DAS2*, *FBA2* y *FBP1* se sobre-expresaron en la cepa KM71LAC412 en BMLacMet frente a BMLac, implicando una sobre-expresión los genes de la vía de asimilación de metanol y sub-expresión de los de gluconeogénesis (**Figura 27** y **Figura 28**).



**Figura 27.** Niveles de expresión de los genes de las enzimas involucradas en el metabolismo del metanol en los diferentes transcriptomas.



**Figura 28.** Estado de los genes de las enzimas involucradas en el metabolismo del metanol en las diferentes comparaciones de los transcriptomas. Los números junto a cada enzima corresponden a los mencionados en la **Figura 27**. Glc1P: glucosa-1-fosfato, Glc6P: glucosa-6-fosfato, Fru6P: fructosa-6-fosfato, FruP2: fructosa-1,6-bifosfato, GAP: gliceraldehído-3-fosfato, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, DHA: dihidroxiacetona, Xyl5P: xilulosa-5-fosfato.

#### 7.1.2.3.4. Expresión diferencial de los genes *LAC4* y *LAC12*

Los datos relacionados con el mapeo de los genes recombinantes *LAC4* y *LAC12* mostraron que, a pesar de que ambos genes fueron insertados en el genoma de *P. pastoris* como parte del mismo vector y regulados cada uno por el mismo promotor, sus niveles transcripcionales en la misma muestra resultaron diferentes (**Tabla 73**). El nivel transcripcional de *LAC12* fue al menos 1.4 veces más alto que el de *LAC4* en todas las comparaciones, y el nivel transcripcional de ambos genes fue significativamente menor que el del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAP*), el cual está controlado por el mismo promotor. La diferencia en la expresión de los genes *LAC* observada en la comparación CEPA se esperaba, debido a que la cepa control no cuenta con los genes *LAC4* y *LAC12*. Sin embargo, existió una diferencia significativa en la

comparación de SISTRATO de los genes *LAC4* y *LAC12*, lo cual resultó inesperado debido a la ausencia de diferencia transcripcional del gen *GAP* en esta comparación.

**Tabla 73.** Niveles de expresión y expresión diferencial de los genes regulados por el promotor *GAP* en los análisis de transcriptoma.

	FPKM GLC- pPIC9	FPKM GLC- LAC412	FPKM LAC- LAC412	FPKM LACMET- LAC412	log <sub>2</sub> fold change CEPA	log <sub>2</sub> fold change SISTRATO	log <sub>2</sub> fold change METANOL
<i>LAC4</i>	3.1	605.6	1677.5	708.8	7.61*	1.47*	-1.24*
<i>LAC12</i>	9.8	892.7	2362.3	1166.02	6.50*	1.40*	-1.02*
<i>GAP</i> ( <i>TDHI</i> )	11401.3	24837.2	26177.6	17280.8	1.12*	0.08	-0.60*

\*: Significativo ( $q \leq 0.05$ )

#### 7.1.2.3.5. Estado transcripcional de un homólogo de factor transcripcional activado por galactosa en otras levaduras

*P. pastoris* no puede emplear galactosa como fuente de carbono, ya que ha perdido la mayoría de los genes del regulón *GAL*, el cual está presente en otras levaduras como *S. cerevisiae* y *K. lactis* (Rubio-Teixeira 2005). Uno de los genes *GAL* retenidos en *P. pastoris* es un homólogo de los genes *GAL4* de *S. cerevisiae* y *LAC9* de *K. lactis*, denominado *PpATT1* o *CRA1* (Jiang et al. 2015; Ata et al. 2018) (PAS\_FragB\_0075). Se ha demostrado que *PpATT1* se encuentra involucrado en la regulación génica para el *fitness* celular, y que su producto es capaz de reconocer la secuencia activadora río arriba de *GAL4* (*GALUAS*, *GAL4 upstream activator sequence*), cuya secuencia consenso es CGGN<sub>11</sub>CCG y se encuentra presente en los promotores de más de 400 genes en *P. pastoris* (Jiang et al. 2015). El análisis de los transcriptomas indicó una sobreexpresión significativa de la transcripción de *PpATT1* en la comparación SISTRATO y una subexpresión en las comparaciones CEPA y METANOL (**Tabla 74**), lo cual puede ser una de las razones de los marcados cambios transcripcionales en las comparaciones.

**Tabla 74.** Niveles de expresión y expresión diferencial del gen *PpATT1* en los análisis de transcriptoma.

	FPKM GLC- pPIC9	FPKM GLC- LAC412	FPKM LAC- LAC412	FPKM LACMET- LAC412	log <sub>2</sub> fold change CEPA	log <sub>2</sub> fold change SISTRATO	log <sub>2</sub> fold change METANOL
<i>PpATT1</i>	379.674	215.77	776.428	479.641	-0.82*	1.85*	-0.69*

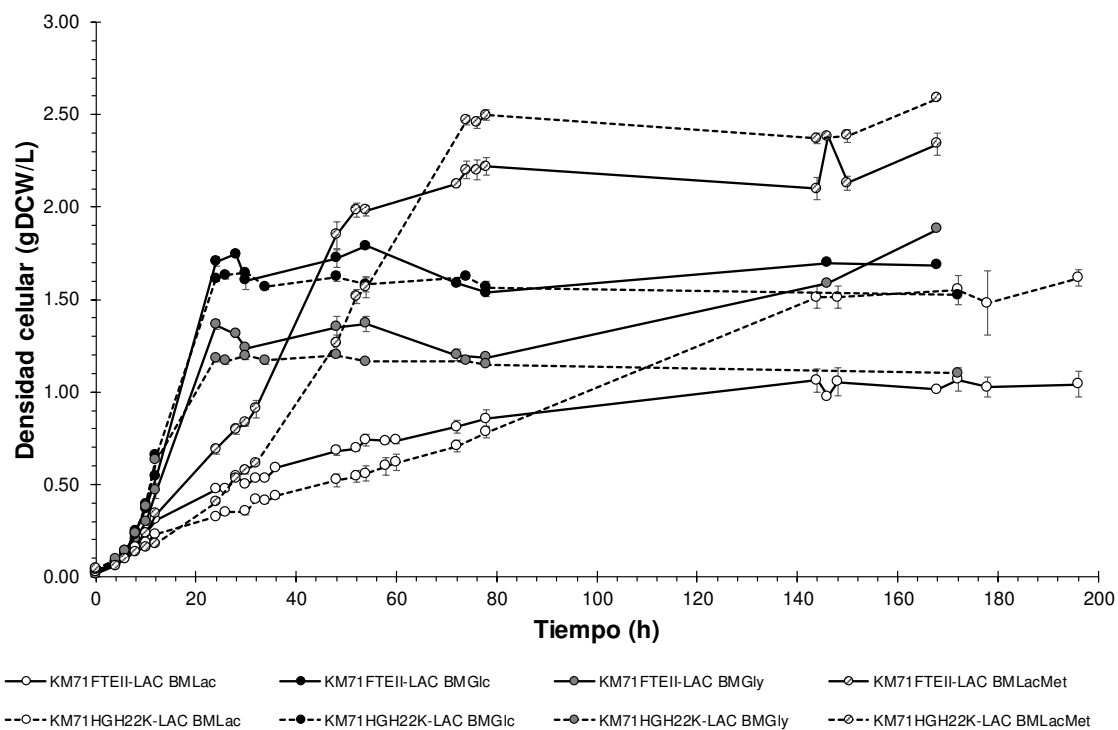
\*: Significativo ( $q \leq 0.05$ )

## **7.2. OBJETIVO 2. Evaluación del comportamiento metabólico de las cepas KM71FTEII-LAC, KM71HGH22K-LAC y sus respectivas cepas control cultivadas en lactosa y otras fuentes de carbono y el efecto de estas fuentes de carbono sobre la regulación de los promotores *AOX1* y *GAP* mediante RT-qPCR.**

### **7.2.1. Evaluación del efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y el rendimiento de biomasa por sustrato de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC**

Con el fin de evaluar el crecimiento de las cepas KM71FTEII-LAC (F-L) y KM71HGH22K-LAC (H-L) en distintas fuentes de carbono se realizaron cultivos en los medios BMLac, BMGlc y BMGly, y además en los medios BMM y BMLacMet. La metodología de los cultivos se expuso en el apartado **6.3.2**. Los medios BMM y BMLacMet se probaron para verificar si el crecimiento de las cepas en un medio con metanol (BMM) era similar al reportado para otras cepas Mut<sup>s</sup> (con crecimiento lento en metanol); y para determinar el comportamiento de las cepas en un medio con metanol y lactosa (BMLacMet), debido a que está reportado que el cultivo con glucosa reprime la expresión de genes necesarios para el metabolismo de metanol. Los cultivos se emplearon para evaluar la  $\mu$  y el  $Y_{x/s}$  en los medios de cultivo mencionados. El incremento de la densidad celular de los cultivos se expondrá en dos gráficas en este apartado, en la primera de las cuales se presentarán los datos de los cultivos de F-L y H-L en BMLac, BMGlc, BMGly y BMLacMet hasta las 200 horas de cultivo, y en la segunda se mostrarán los datos de los cultivos de F-L y H-L en BMLac y BMLacMet (los mismos cultivos empleados para la primera gráfica) truncados hasta las 24 h para compararlos con los datos de ambas cepas en BMM hasta las 24 h.

Las cinéticas de crecimiento de las cepas KM71FTEII-LAC (F-L) y KM71HGH22K-LAC (H-L) (**Figura 29**) mostraron que ambas cepas fueron capaces de crecer en el medio BMLac con lactosa como única fuente de carbono. Sin embargo, el crecimiento de ambas cepas en BMLac no presentó el crecimiento exponencial característico de los cultivos en BMGlc y BMGly, ya que los cultivos en BMLac alcanzaron la fase estacionaria después de al menos 72 h de cultivo, a diferencia los cultivos en BMGlc y BMGly, que alcanzaron la fase estacionaria en menos de 24 h.

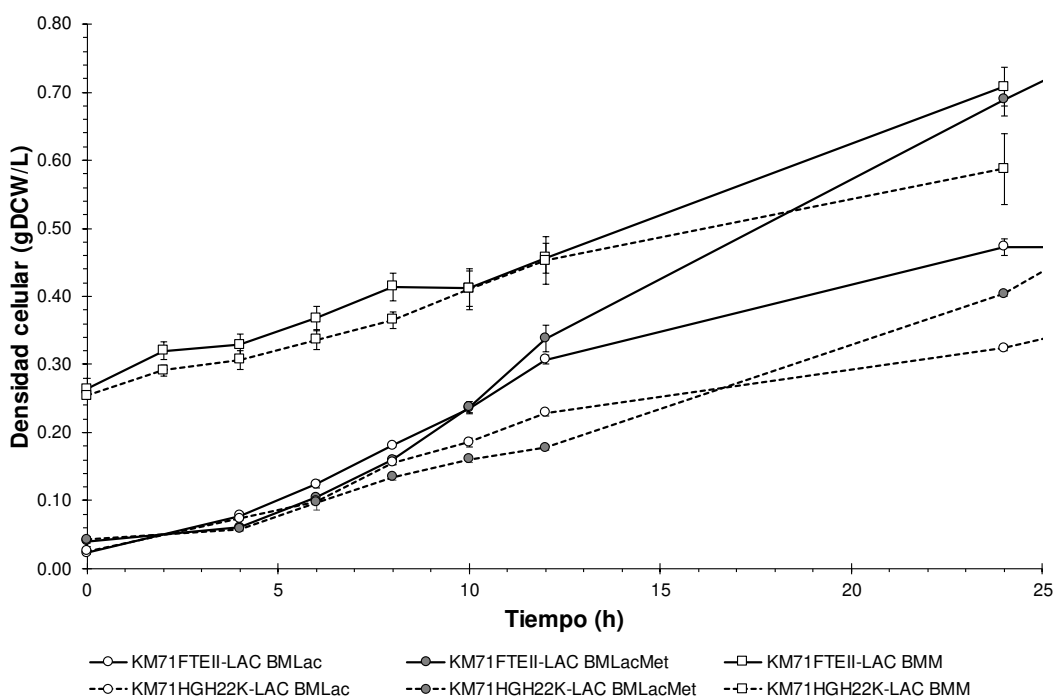


**Figura 29.** Cinéticas de crecimiento de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en BMLac, BMGlc, BMGly y BMLacMet. Las barras de error indican error estándar.

El medio de cultivo con el que se obtuvo la mayor densidad celular de F-L y H-L fue el medio BMLacMet (BMLac adicionado con 0.75 % metanol antes del inicio del cultivo) (**Figura 29**), mientras que los cultivos en medio BMLac alcanzaron el 40 % en la cepa F-L o el 60 % en la cepa H-L de la densidad celular obtenida en medio BMLacMet. Las cepas cultivadas en BMLacMet llegaron a la fase estacionaria de cultivo antes que cuando se cultivaron BMLac. La cepa H-L presentó densidades celulares más bajas que la cepa F-L en BMLac y BMLacMet al principio del cultivo, sin embargo, alrededor de las 72 h la cepa H-L superó las densidades celulares alcanzadas por F-L en estos medios.

El cálculo de las  $\mu$  de F-L y H-L en BMLac y BMLacMet se realizó en dos fases: la primera (1F) abarcó las primeras 12 h de la cinética de crecimiento y comprendió el crecimiento que se pudo deber a restos intracelulares del medio de cultivo del inóculo, y la segunda (2F), desde las 24 h hasta el inicio de la fase estacionaria en BMLac, la cual fue variable entre las dos cepas (hasta las 78 h en F-L y hasta las 144 h en H-L) o con todos los puntos muestrales en BMLacMet.

Los cultivos de F-L y H-L en medio BMM (**Figura 30**) mostraron una  $\mu$  similar a la de los cultivos en medio BMLac, o hasta 3 veces menor a la de los cultivos en medio BMLacMet. La densidad celular de los cultivos en BMM a las 24 h fue similar a la del cultivo de F-L en BMLacMet, a pesar de que los cultivos en BMM iniciaron con una densidad celular 10 veces más alta que la empleada para iniciar los cultivos en BMLac y BMLacMet. El crecimiento lento en BMM se debe al fenotipo Mut<sup>s</sup> (utilización lenta de metanol) de las cepas KM71 de *P. pastoris*.



**Figura 30.** Cinéticas de crecimiento de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en BMM, BMLac y BMLacMet. Se muestran los datos hasta las 24 h de los cultivos en BMLac y BMLacMet. Las barras de error indican error estándar.

Las  $\mu$  en BMLac de F-L y H-L (**Tabla 75**) fueron significativamente más bajas a las alcanzadas en BMGlc o BMGly, siendo aproximadamente  $\sim 75\%$  del valor de estas últimas. Las  $\mu$  en BMLac de F-L y H-L no fueron significativamente diferentes a las de BMLacMet. Las  $\mu$  en BMGlc o BMGly de ambas cepas no tuvieron diferencia significativa entre cepas o fuentes de carbono. Las  $\mu$  en BMM de ambas cepas fueron significativamente menores a las obtenidas en el resto de los medios de cultivo, y no tuvieron diferencia significativa entre las dos cepas. La menor  $\mu$  en BMM se debe a que las cepas de *P. pastoris* son cepas Mut<sup>s</sup>, que presentan un fenotipo de utilización lenta del metanol.

**Tabla 75.** Velocidad específica de crecimiento y rendimientos de biomasa/sustrato de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-Lac en BMLac, BMGlc, BMGly, BMLacMet y BMM.

C	Medio	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (gDCW/g)	$Y_{x/s}$ (gDCW/mol)	$Y_{x/s}$ (gDCW/mol <sub>C</sub> )
KM71FTEII-LAC	BMLac	1F: 0.197 ± 0.031* 2F: 0.011 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.104 ± 0.01 <sup>a</sup>	35.456 ± 3.456 <sup>a</sup>	2.955 ± 0.288 <sup>a</sup>
	BMGlc	0.261 ± 0.034 <sup>b</sup>	0.362 ± 0.008 <sup>bc</sup>	65.301 ± 1.524 <sup>b</sup>	10.883 ± 0.254 <sup>bc</sup>
	BMGly	0.251 ± 0.048 <sup>b</sup>	0.422 ± 0.07 <sup>c</sup>	38.886 ± 6.454 <sup>a</sup>	12.962 ± 2.151 <sup>b</sup>
	BMLacMet	1F: 0.202 ± 0.017 2F: 0.100 ± 0.008 <sup>c</sup>	0.144 ± 0.004 <sup>a</sup>	NC	4.281 ± 0.133 <sup>ad</sup>
	BMM**	0.037 ± 0.008 <sup>ad</sup>	0.162 ± 0.029 <sup>a</sup> (0.080 ± 0.014)	5.180 ± 0.934 <sup>c</sup> (2.578 ± 0.433)	5.180 ± 0.934 <sup>d</sup> (2.578 ± 0.433)
KM71HGH22K-LAC	BMLac	1F: 0.187 ± 0.007 2F: 0.013 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.159 ± 0.008 <sup>a</sup>	54.511 ± 2.599 <sup>d</sup>	4.543 ± 0.217 <sup>ad</sup>
	BMGlc	0.256 ± 0.023 <sup>b</sup>	0.326 ± 0.002 <sup>b</sup>	58.754 ± 0.380 <sup>bd</sup>	9.792 ± 0.063 <sup>c</sup>
	BMGly	0.240 ± 0.015 <sup>b</sup>	0.428 ± 0.006 <sup>c</sup>	39.39 ± 0.547 <sup>a</sup>	13.130 ± 0.182 <sup>b</sup>
	BMLacMet	1F: 0.174 ± 0.032 2F: 0.082 ± 0.002 <sup>cd</sup>	0.161 ± 0.001 <sup>a</sup>	NC	4.787 ± 0.028 <sup>ad</sup>
	BMM**	0.031 ± 0.012 <sup>a</sup>	0.101 ± 0.038 <sup>a</sup> (0.062 ± 0.023)	3.22 ± 1.212 <sup>c</sup> (1.984 ± 0.743)	3.22 ± 1.212 <sup>ad</sup> (1.984 ± 0.743)

Los datos indican promedios (n ≥ 2) con sus respectivas desviaciones estándar. C: Cepa.

NC: no se calculó, por ser una mezcla de fuentes de carbono. mol<sub>C</sub>: moles de carbono.

1F:  $\mu$  calculada de las 0 a las 12 h. 2F:  $\mu$  calculada de las 24 h hasta el inicio de la fase estacionaria en BMLac y con todos los puntos muestrales en BMLacMet. \*Los datos de 1F no presentaron diferencia significativa entre las cepas al comparar la misma fuente de carbono. \*\*:  $\mu$  calculada con los cultivos en BMM con los que se realizó la cinética, los rendimientos de estos cultivos (datos en *itálicas*) se calcularon antes de que los cultivos alcanzaran la fase estacionaria, por lo que son menores que los rendimientos reales. Los rendimientos empleados en la estadística corresponden a los obtenidos en cultivos de inducción posteriores (ver **Tabla 78**), promediando los rendimientos obtenidos a las 24 y 48 h con la condición de cultivo BMG a 30 °C de la respectiva cepa.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados.

Los  $Y_{x/s}$  por mol de sustrato de las cepas F-L y H-L (**Tabla 75**) en BMLac, calculados con la densidad celular máxima observada después de 144 h de cultivo, no fueron significativamente distintos a los obtenidos en BMGly (en el caso de F-L) o BMGlc (en el caso de H-L). El  $Y_{x/s}$  por mol de sustrato en BMLac fue significativamente más alto en H-L respecto a F-L. Las dos cepas cultivadas en BMM no tuvieron diferencias significativas en cuanto a  $\mu$  o  $Y_{x/s}$ , por lo que se puede suponer que los genes heterólogos no tuvieron un efecto observable sobre su crecimiento en metanol.

Los  $Y_{x/s}$  por mol de carbono en los cultivos de ambas cepas (**Tabla 75**) fueron más altos en BMGly que en el resto de los medios de cultivo, siendo estadísticamente



significativa esta diferencia en los de la cepa H-L. Los  $Y_{x/s}$  por mol de carbono ( $\text{mol}_C$ ) en BMLac no presentaron diferencia significativa con los rendimientos en BMLacMet en ambas cepas. Los  $Y_{x/s}$  por  $\text{mol}_C$  en BMLacMet teóricamente deberían corresponder al promedio ponderado de los obtenidos en BMLac y BMM, debido a que BMLacMet contiene la misma cantidad de lactosa que BMLac y de metanol que BMM. Este rendimiento teórico se calculó multiplicando los rendimientos de biomasa por  $\text{mol}_C$  obtenidos en lactosa o metanol por la proporción de moles de carbono con la que contribuye cada sustrato al medio BMLac ( $\text{mol}_C$  lactosa o metanol/  $\text{mol}_C$  totales) y luego sumando los resultados de ambas fuentes de carbono. Los rendimientos teóricos resultaron en 3.72 gDCW/ $\text{mol}_C$  para F-L y 4.08 gDCW/ $\text{mol}_C$  para H-L. Los rendimientos observados en BMLacMet fueron de  $4.281 \pm 0.133$  gDCW/ $\text{mol}_C$  para F-L y  $4.787 \pm 0.028$  gDCW/ $\text{mol}_C$  para H-L, por lo que el rendimiento por  $\text{mol}_C$  en ambas fuentes de carbono fue mayor, aunque no significativamente, a lo que se esperaría teóricamente.

En todos los  $Y_{x/s}$  calculados (por gramo, por mol y por mol de carbono) para los cultivos en BMLac, las tres cepas LAC (KM71LAC412 [ver **Tabla 67**], F-L y H-L) presentaron diferencias significativas con la cepa KM71pPIC9, y la cepa KM71LAC412 no presentó diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) con las cepas F-L y H-L, pero estas dos últimas sí lo hicieron entre sí en el  $Y_{x/s}$  por mol de lactosa, al ser el  $Y_{x/s}$  de H-L mayor al de F-L. Incluso el  $Y_{x/s}$  por gramo y por moles de carbono en BMLac también fue más alto en H-L que en F-L, aunque la diferencia no resultó significativa. Esta diferencia en el crecimiento en lactosa de las dos cepas puede deberse a eventos distintos de integración de los genes *LAC*, debido a que las cepas LAC no provienen de un único evento de transformación. El orden de los rendimientos en BMLac, de mayor a menor, fue H-L, KM71LAC412, F-L y KM71pPIC9.

Las  $\mu$  y todos los  $Y_{x/s}$  calculados en BMGlc y BMGly para las cepas F-L, H-L, KM71LAC412 y KM71pPIC9 no presentaron diferencia significativa entre las cuatro cepas cultivadas en el mismo medio. Esto indica que la presencia de los genes heterólogos *LAC* no añaden una carga metabólica respecto al crecimiento en glucosa o glicerol.

### **7.2.2. Evaluación del efecto de la fuente de carbono en la expresión de genes regulados por el promotor *AOXI* en cultivos en metanol**

Los resultados que se presentarán en este apartado evalúan el efecto de la fuente de carbono empleada en la fase de generación de biomasa sobre la expresión de genes regulados por el promotor *AOXI* durante la fase de inducción en medio con metanol. Los cultivos se llevaron a cabo en dos fases, como se explicó en la metodología (6.3.3): la primera consistió en la generación de biomasa celular en cultivos con lactosa o glicerol, la segunda inició después de transferir esta biomasa al medio de inducción con metanol.

Se deben hacer aclaraciones respecto a la terminología empleada en la descripción de las comparaciones entre las condiciones de cultivo probadas. En el texto se hará referencia a las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC como F-L y H-L, respectivamente. El tiempo de muestreo (0, 24 o 48 h) corresponde al tiempo transcurrido desde el inicio de la segunda fase del cultivo, por lo que las muestras de las 24 y 48 h proceden de cultivos en medio con metanol (BMM). Las muestras de 0 h se obtuvieron al final de la primera fase, antes de transferir la biomasa al BMM, por lo que las muestras se obtuvieron de cultivos en BMLac o BMG. Como se buscó comparar el efecto del sustrato utilizado en la primera fase del cultivo, se emplean los términos “cultivo en BMG” o “cultivo en BMLac” a pesar de que las muestras de 24 y 48 h fueran de cultivos en BMM.

El medio BMG utilizado en la fase de generación de biomasa se diferencia del medio BMGly empleado en las cinéticas de crecimiento en la concentración de glicerol, siendo de 30 mM o 0.27 % para BMGly y de 108.59 mM o 1 % para BMG. Se empleó el medio BMGly en las cinéticas de crecimiento para comparar el crecimiento con otros sustratos a la misma concentración molar, y el medio BMG en los cultivos de inducción por ser el medio usado en el grupo de trabajo en la primera fase de este tipo de cultivos.

El análisis estadístico para determinar si las variables evaluadas presentaban diferencia significativa se realizó empleando los diseños experimentales expuestos previamente en el apartado 6.3.3.11 y los resultados se describen en el texto, mientras que la comparación entre todas las condiciones de cultivo de las cepas (datos presentados dentro de la misma columna en las tablas del apartado 7.2.2) se realizó con un ANOVA unifactorial y prueba de Tukey y los resultados se exponen en las tablas y el texto.

### 7.2.2.1. Rendimientos de biomasa por unidad de sustrato

Los datos de la densidad celular de los cultivos (incluidos en la **Tabla 102** y la **Tabla 103** en el **Anexo 3**), se estimaron multiplicando la  $DO_{600\text{ nm}}$  del cultivo por un factor de conversión (0.23) determinado y empleado previamente en el grupo de trabajo (Balderas-Cisneros 2016). A partir de estos datos, se calculó el incremento de la densidad celular de los cultivos durante la fase de inducción con metanol. El incremento de densidad celular de las 0 a las 48 h de inducción en BMM (**Tabla 76**), en  $DO_{600\text{ nm}}$  y gDCW/L, fue en general mayor para los cultivos de la cepa KM71FTEII-LAC (con incrementos en un rango de 3.95 a 5.14 gDCW/L) en comparación con los de KM71HGH22K-LAC (con incrementos en un rango de 2.84 a 4.31 gDCW/L) bajo las mismas condiciones de cultivo, sin embargo el mayor incremento en F-L respecto a H-L sólo fue estadísticamente significativo cuando se generó biomasa en BMG. Al comparar los incrementos entre las distintas condiciones de cultivo de la misma cepa, no hubo diferencia significativa entre las distintas condiciones de F-L, sin embargo, la cepa H-L presentó un incremento significativamente mayor en BMLac respecto a BMG al ser cultivada a 24 °C.

**Tabla 76.** Incremento de densidad celular de las 0 a las 48 h de inducción, en  $DO_{600\text{ nm}}$  y en g/L.

Cepa	Tempe- ratura	Medio de generación de biomasa	Incremento de densidad celular de las 0 a las 48 h de inducción	
			$DO_{600\text{ nm}}$	gDCW/L
KM71FTEII-LAC	30 °C	BMG	19.03 ± 1.93 <sup>a</sup>	4.38 ± 0.44 <sup>a</sup>
		BMG (+ CaCl <sub>2</sub> )*	17.17 ± 2.93 <sup>ab</sup>	3.95 ± 0.67 <sup>ab</sup>
		BMLac	19.27 ± 1.10 <sup>a</sup>	4.43 ± 0.25 <sup>a</sup>
		BMLac (+ CaCl <sub>2</sub> )	17.87 ± 1.29 <sup>ab</sup>	4.11 ± 0.30 <sup>ab</sup>
	24 °C	BMG	20.60 ± 2.72 <sup>a</sup>	4.74 ± 0.63 <sup>a</sup>
		BMG (+ CaCl <sub>2</sub> )	18.07 ± 6.93 <sup>ab</sup>	4.16 ± 1.59 <sup>ab</sup>
		BMLac	20.17 ± 0.78 <sup>a</sup>	4.64 ± 0.18 <sup>a</sup>
		BMLac (+ CaCl <sub>2</sub> )	22.33 ± 1.20 <sup>a</sup>	5.14 ± 0.28 <sup>a</sup>
KM71 HGH22K- LAC	30 °C	BMG	12.37 ± 1.62 <sup>b</sup>	2.84 ± 0.37 <sup>b</sup>
		BMLac	16.43 ± 2.19 <sup>ab</sup>	3.78 ± 0.50 <sup>ab</sup>
	24 °C	BMG	12.67 ± 2.61 <sup>b</sup>	2.91 ± 0.60 <sup>b</sup>
		BMLac	18.73 ± 1.32 <sup>a</sup>	4.31 ± 0.30 <sup>a</sup>

\*Se refiere al empleo de BMM + CaCl<sub>2</sub> como medio de inducción, en comparación con el medio sin CaCl<sub>2</sub>. Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar. La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los datos de una misma columna se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados.

El ANOVA trifactorial para determinar el efecto de los factores temperatura, fuente de carbono en el medio de generación de biomasa y adición de CaCl<sub>2</sub> al medio de inducción sobre los incrementos de densidad celular de F-L confirmó que ninguno de los tres factores analizados fue significativo. Asimismo, el ANOVA bifactorial para determinar el efecto de los factores temperatura y fuente de carbono inicial sobre los incrementos de densidad celular de H-L mostró diferencias significativas para el factor fuente de carbono empleado en la fase de generación de biomasa ( $p \leq 0.01$ ), con un incremento de biomasa a las 48 h de inducción hasta 1.5 veces mayor cuando se empleó BMLac en comparación con BMG para la cepa H-L en ambas temperaturas.

El  $Y_{x/s}$  por mol de sustrato calculado al terminar la fase de generación de biomasa (~12 h), utilizando para el cálculo la cantidad en g o moles totales de glicerol o lactosa al inicio del cultivo ya que no se determinó la cantidad consumida por las células (**Tabla 77**), fue siempre menor en BMG en todas las condiciones de cultivo de F-L y H-L, alcanzando rendimientos cercanos a la mitad que los de BMLac de la misma cepa y temperatura de cultivo. Sin embargo, esto pudo deberse a que los cultivos no consumieron por completo el glicerol en el medio al momento de transferir las células a BMM (~12 h de cultivo), lo cual se evidencia en los rendimientos más bajos en BMG a 30 °C en comparación con los calculados en las cinéticas de crecimiento presentadas en el apartado **7.2.1** (ver **Tabla 75**), donde se obtuvo más del doble de los valores de rendimiento al calcularse con la biomasa máxima obtenida.

**Tabla 77.** Rendimiento de biomasa por sustrato al finalizar la fase de generación de biomasa, en gDCW/g y gDCW/mol.

Cepa	Tempe- ratura	Medio de generación de biomasa	Rendimiento de biomasa por sustrato al finalizar la fase de generación de biomasa (~12 h)	
			gDCW/mol	gDCW/g
KM71FTEI I-LAC	30 °C	BMG	16.54 ± 1.72 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>a</sup>
		BMLac	35.69 ± 4.23 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>
	24 °C	BMG	7.21 ± 2.39 <sup>c</sup>	0.08 ± 0.03 <sup>bc</sup>
		BMLac	20.57 ± 7.08 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>c</sup>
KM71 HGH22K- LAC	30 °C	BMG	16.93 ± 1.51 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>a</sup>
		BMLac	30.13 ± 0.96 <sup>bd</sup>	0.09 ± 0.00 <sup>bc</sup>
	24 °C	BMG	15.63 ± 3.08 <sup>ac</sup>	0.17 ± 0.03 <sup>a</sup>
		BMLac	24.15 ± 2.01 <sup>ad</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>bc</sup>

\*Se refiere al empleo de BMM + CaCl<sub>2</sub> como medio de inducción, en comparación con el medio sin CaCl<sub>2</sub>. Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar. La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los datos de una misma columna se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados.

La cepa F-L en BMLac a 30 °C obtuvo valores de rendimiento similares a los reportados previamente (apartado 7.2.1, **Tabla 75**), pero la H-L presentó un menor rendimiento en comparación con los datos previos. Este comportamiento puede explicarse porque la cepa F-L alcanza la fase estacionaria de cultivo antes que la H-L, así que es probable que los cultivos en H-L no hayan agotado la fuente de carbono a las ~12 h de cultivo, mientras que los de F-L la consumieron por completo.

El  $Y_{x/s}$  calculado a las 24 o 48 h del cultivo de inducción (**Tabla 78**), considerando el metanol total añadido al cultivo antes de la toma de muestra, fue mayor a las 48 h que a las 24 h, tanto en gDCW/g como en gDCW/mol. Los cultivos en metanol provenientes de BMG y BMLac para generar biomasa no presentaron diferencias significativas en el rendimiento, excepto en la cepa H-L a 24 °C, donde el rendimiento en el cultivo con metanol fue mayor a las 48 h en BMLac en comparación con BMG. No hubo diferencia significativa entre las dos cepas en la misma condición de cultivo empleada para la generación de biomasa, excepto a las 48 h en BMG inicial tanto a 30 °C como a 24 °C, donde el rendimiento fue mayor para F-L (sin CaCl<sub>2</sub> en el medio) que para H-L.

**Tabla 78.** Rendimiento de biomasa por sustrato a las 24 y 48 h de la fase de inducción con metanol, en gDCW/g y gDCW/mol.

Cepa	Temperatura	Medio de generación de biomasa	Rendimiento de biomasa por sustrato en la fase de inducción con metanol			
			gDCW/g		gDCW/mol	
			24 h	48 h	24 h	48 h
KM71FTEII-LAC	30 °C	BMG	0.12 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.98 ± 0.16 <sup>ab</sup>	5.91 ± 0.60 <sup>a</sup>
		BMG (+ CaCl <sub>2</sub> )*	0.17 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.17 ± 0.03 <sup>ab</sup>	5.49 ± 0.65 <sup>ab</sup>	5.33 ± 0.91 <sup>ab</sup>
		BMLac	0.12 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.91 ± 0.66 <sup>ab</sup>	5.98 ± 0.34 <sup>a</sup>
		BMLac (+ CaCl <sub>2</sub> )	0.15 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>ab</sup>	4.89 ± 0.28 <sup>ab</sup>	5.55 ± 0.40 <sup>ab</sup>
	24 °C	BMG	0.18 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.03 <sup>a</sup>	5.71 ± 1.29 <sup>a</sup>	6.40 ± 0.85 <sup>a</sup>
		BMG (+ CaCl <sub>2</sub> )	0.18 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.18 ± 0.07 <sup>ab</sup>	5.67 ± 3.14 <sup>ab</sup>	5.61 ± 2.15 <sup>ab</sup>
		BMLac	0.13 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.02 ± 0.73 <sup>ab</sup>	6.26 ± 0.24 <sup>a</sup>
		BMLac (+ CaCl <sub>2</sub> )	0.16 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>a</sup>	5.13 ± 1.04 <sup>ab</sup>	6.94 ± 0.37 <sup>a</sup>
KM71HGH22 K-LAC	30 °C	BMG	0.08 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.61 ± 1.51 <sup>b</sup>	3.84 ± 0.50 <sup>b</sup>
		BMLac	0.09 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>ab</sup>	2.80 ± 0.72 <sup>b</sup>	5.10 ± 0.68 <sup>ab</sup>
	24 °C	BMG	0.11 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.46 ± 0.52 <sup>ab</sup>	3.93 ± 0.81 <sup>b</sup>
		BMLac	0.15 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.82 ± 0.69 <sup>ab</sup>	5.82 ± 0.41 <sup>a</sup>

\*Se refiere al empleo de BMM + CaCl<sub>2</sub> como medio de inducción, en comparación con el medio sin CaCl<sub>2</sub>. Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar. La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los datos de una misma columna se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados.

### 7.2.2.2. Rendimiento de proteína intracelular producida por unidad de biomasa

Los rendimientos de proteína intracelular producida por unidad de biomasa (en mg/g) se calcularon como se indica en el apartado 6.3.3.4.1. Los rendimientos de proteína intracelular por unidad de biomasa a los distintos tiempos de inducción se muestran en la **Tabla 79**. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los rendimientos obtenidos en las cuatro condiciones de cultivo empleadas para cada cepa en el mismo tiempo muestral. El mayor rendimiento de proteína intracelular por biomasa, a las 0, 24 y 48 h, lo obtuvo la cepa F-L cultivada a 30 °C en BMLac inicial. El rendimiento obtenido de la cepa F-L no presentó diferencias significativas al comparar las condiciones de cultivo en el mismo tiempo muestral, ni entre los tiempos muestrales de cada condición, excepto en BMLac inicial a 30 °C, cuyo rendimiento a las 48 h fue significativamente menor a los de las 0 y 24 h de la misma condición. La cepa H-L presentó el menor rendimiento a las 24 h de inducción en las condiciones de cultivo a 30 °C, y obtuvo rendimientos significativamente menores a las 24 h en todas las condiciones excepto en BMG inicial a 24 °C.

**Tabla 79.** Rendimiento de proteína intracelular producida por unidad de biomasa a 0, 24 y 48 h de inducción.

Cepa	Tempe- ratura	Medio de generación de biomasa	Proteína intracelular por unidad de biomasa (mg/gDCW)		
			0 h	24 h	48 h
KM71FTEII- LAC	30 °C	BMG	199.91 ± 38.54 <sup>ab</sup>	235.41 ± 35.27 <sup>abc</sup>	172.73 ± 39.90 <sup>a</sup>
		BMLac	276.52 ± 20.71 <sup>a</sup>	295.86 ± 29.34 <sup>a</sup>	200.58 ± 30.16 <sup>a</sup>
	24 °C	BMG	216.10 ± 35.93 <sup>ab</sup>	263.78 ± 88.58 <sup>ab</sup>	152.04 ± 5.64 <sup>a</sup>
		BMLac	194.56 ± 41.28 <sup>ab</sup>	254.12 ± 101.11 <sup>abc</sup>	163.85 ± 54.10 <sup>a</sup>
KM71HGH22K- LAC	30 °C	BMG	163.97 ± 16.14 <sup>b</sup>	68.44 ± 24.76 <sup>c</sup>	133.58 ± 15.26 <sup>a</sup>
		BMLac	217.92 ± 35.61 <sup>ab</sup>	71.52 ± 48.91 <sup>bc</sup>	172.23 ± 29.26 <sup>a</sup>
	24 °C	BMG	160.36 ± 33.02 <sup>b</sup>	180.76 ± 112.13 <sup>abc</sup>	121.93 ± 56.60 <sup>a</sup>
		BMLac	152.49 ± 10.78 <sup>b</sup>	116.73 ± 38.83 <sup>abc</sup>	182.30 ± 13.76 <sup>a</sup>

Los datos de la cepa KM71FTEII-LAC se obtuvieron de los cultivos en los que se empleó BMM (no BMM-CaCl<sub>2</sub>) como medio de inducción.

Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los datos de una misma columna se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Números en *italicas* indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con el resto de los tiempos de la misma condición.

El análisis estadístico por ANOVA trifactorial mostró que a las 0 h (antes de transferir las células a BMM) la concentración de proteína intracelular difirió significativamente entre las cepas ( $p \leq 0.01$ ) y las temperaturas de cultivo ( $p \leq 0.05$ ), y que la interacción temperatura-fuente de carbono ( $p \leq 0.01$ ) fue significativa. A las 24 h existió diferencia significativa entre los rendimientos de las cepas ( $p \leq 0.01$ ), ya que en la cepa H-L fueron más bajos que en la cepa F-L. A las 48 h, los rendimientos en las condiciones de cultivo con BMLac fueron mayores en comparación con la misma condición de cultivo de cada cepa en BMG, aunque la diferencia no fue significativa.

### **7.2.2.3. Actividad y rendimiento de $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa**

Los datos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa, en unidades por mg de proteína intracelular (**Tabla 80, Figura 31**), mostraron en general una disminución significativa de la actividad al transferir a las células al medio de cultivo con metanol (de las 0 h a las 24 h). La actividad de  $\beta$ -galactosidasa en la cepa F-L fue significativamente mayor a la presentada por la cepa H-L en todas las condiciones de cultivo a las 0 h de inducción. A las 0 h, en todas las condiciones de cultivo y cepas se encontró una mayor actividad en las células cultivadas en BMG inicial en comparación con las cultivadas en BMLac inicial. A las 24 y 48 h, no se presentó diferencia significativa por efecto de la fuente de carbono inicial en ambas cepas. No se presentó diferencia significativa por efecto la temperatura, excepto para H-L cultivada en BMLac a las 24 h (mayor actividad a 30 °C) y para F-L cultivada en BMG inicial a las 48 h (mayor actividad a 24 °C). Es posible que la variación en los datos presentados sea mayor en proporción con los reportados para los parámetros anteriores, debido a que la muestras fueron sometidas a un mayor número de procesos experimentales.

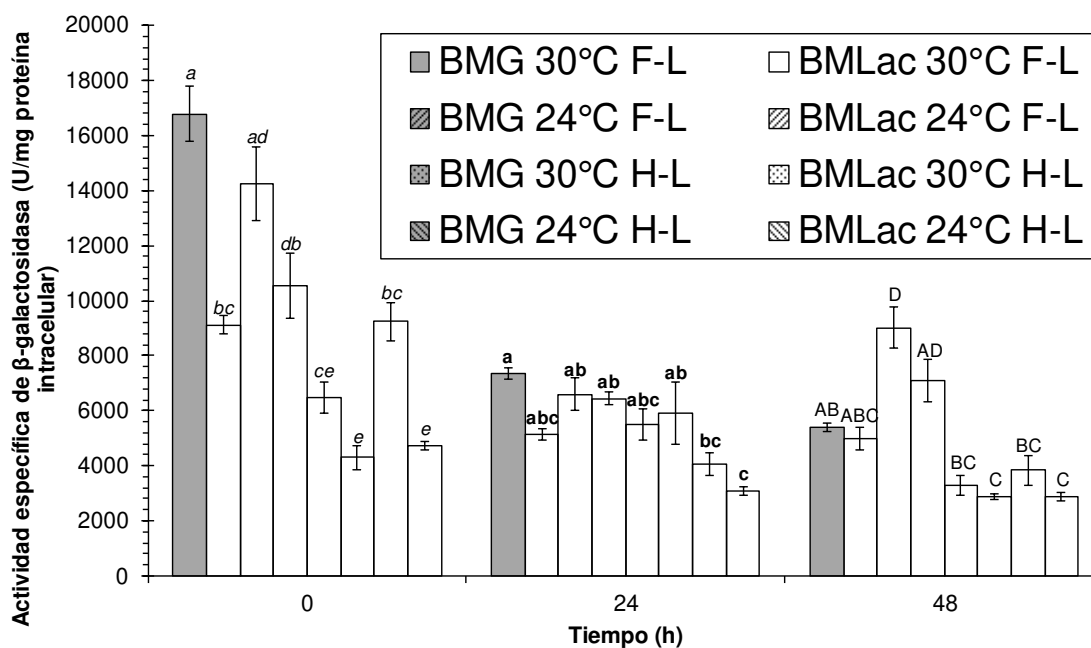
**Tabla 80.** Actividad de  $\beta$ -galactosidasa (U/mg proteína) a las 0, 24 y 48 h de inducción.

Cepa	Tempe- ratura	Medio de generación de biomasa	Actividad de $\beta$ -galactosidasa (U/mg proteína intracelular) a diferentes tiempos de inducción		
			0 h	24 h	48 h
KM71 FTEII- LAC	30 °C	BMG	<i>16794.41 ± 1731.68<sup>a</sup></i>	<i>7354.95 ± 317.25<sup>a</sup></i>	<i>5398.85 ± 286.64<sup>ab</sup></i>
		BMLac	<i>9121.88 ± 589.80<sup>bc</sup></i>	<i>5133.32 ± 361.42<sup>abc</sup></i>	<i>4972.03 ± 705.96<sup>abc</sup></i>
	24 °C	BMG	<i>14267.83 ± 2306.99<sup>ad</sup></i>	<i>6584.40 ± 1025.54<sup>ab</sup></i>	<i>9022.19 ± 1283.03<sup>d</sup></i>
		BMLac	<b><i>10537.44 ± 2048.84<sup>db</sup></i></b>	<b><i>6436.89 ± 403.86<sup>ab</sup></i></b>	<i>7084.22 ± 1360.65<sup>ad</sup></i>
KM71 HGH22K- LAC	30 °C	BMG	<i>6487.55 ± 986.52<sup>ce</sup></i>	<i>5508.32 ± 957.38<sup>abc</sup></i>	<i>3286.37 ± 633.58<sup>bc</sup></i>
		BMLac	<i>4304.71 ± 742.77<sup>e</sup></i>	<i>5905.97 ± 1983.20<sup>ab</sup></i>	<i>2875.09 ± 151.23<sup>c</sup></i>
	24 °C	BMG	<i>9238.73 ± 1186.27<sup>bc</sup></i>	<i>4081.46 ± 715.31<sup>bc</sup></i>	<i>3837.31 ± 960.6<sup>bc</sup></i>
		BMLac	<i>4723.37 ± 234.78<sup>e</sup></i>	<i>3076.84 ± 272.28<sup>e</sup></i>	<i>2879.65 ± 233.68<sup>c</sup></i>

Los datos de la cepa KM71FTEII-LAC se obtuvieron de los cultivos en los que se empleó BMM (no BMM-CaCl<sub>2</sub>) como medio de inducción.

Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Números en *itálicas* indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con el resto de los tiempos de la misma condición. Números en **negritas** indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) solo entre estos tiempos de la misma condición.



**Figura 31.** Actividad de  $\beta$ -galactosidasa, en U/mg proteína intracelular, a las 0, 24 y 48 h de inducción, de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en BMG y BMLac inicial a 30 y 24 °C. Las barras de error indican el error estándar. Letras iguales sobre las barras indican condiciones sin diferencia significativa dentro del mismo tiempo muestral: minúsculas en *itálicas* a las 0 h, minúsculas en **negritas** a las 24 h y mayúsculas a las 48 h.



El cálculo del rendimiento de unidades de  $\beta$ -galactosidasa producidas por unidad de biomasa (**Tabla 81, Figura 32**) mostró que, a las 0 h, existió diferencia significativa para los factores cepa y fuente de carbono, así como para los tres pares de interacciones entre factores. A las 0 h, la cepa F-L obtuvo rendimientos significativamente superiores a la cepa H-L, y los rendimientos en los cultivos en BMG fueron más altos que los de los cultivos en BMLac de la misma cepa y temperatura. La diferencia entre las fuentes de carbono a las 0 h puede ser debida a la diferencia en el estado metabólico de las células. Para F-L, el tiempo influyó significativamente sobre el rendimiento, con una disminución progresiva de éste, especialmente en las condiciones de cultivo a 30 °C. Para H-L, la interacción entre el tiempo y la fuente de carbono tuvo efecto significativo. En general, los rendimientos a las 0 h en ambas cepas fueron significativamente mayores ( $p \leq 0.05$ ) a los de las 24 y 48 h.

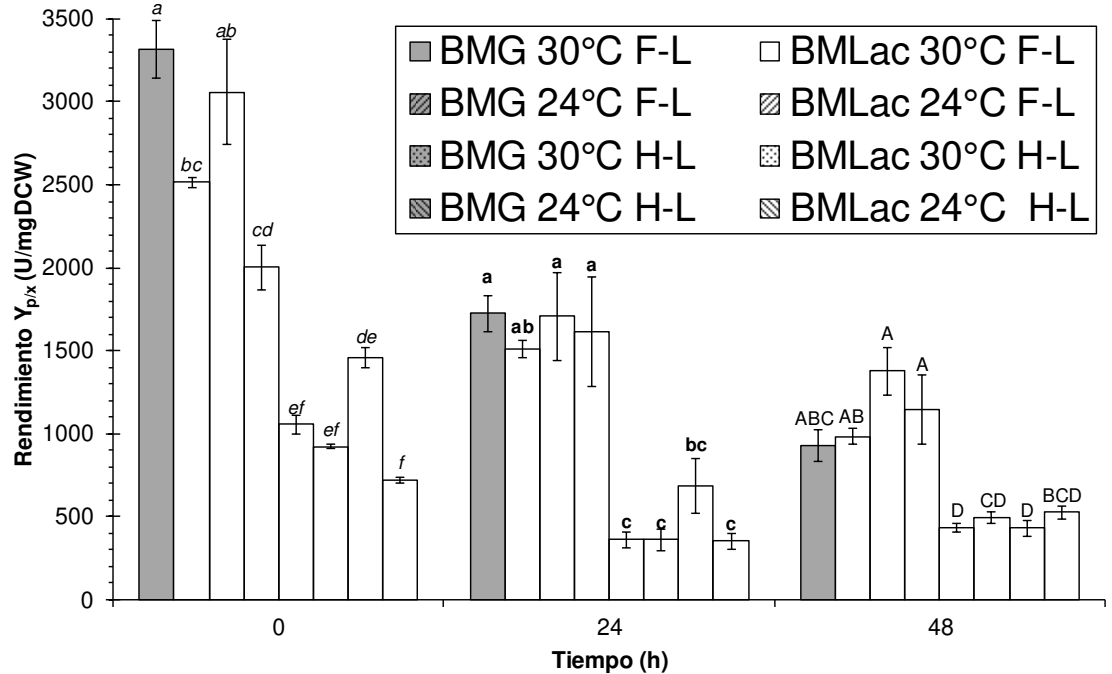
**Tabla 81.** Rendimiento de  $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa (U/mgDCW) a las 0, 24 y 48 h de inducción.

Cepa	Temperatura	Medio de generación de biomasa	Rendimiento de $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa (U/mgDCW) a diferentes tiempos de inducción		
			0 h	24 h	48 h
KM71 FTEII-LAC	30 °C	BMG	<i>3313.58 ± 298.77<sup>a</sup></i>	<i>1724.07 ± 189.9<sup>a</sup></i>	<i>925.64 ± 166.18<sup>abc</sup></i>
		BMLac	<i>2514.57 ± 52.72<sup>bc</sup></i>	<i>1512.71 ± 87.54<sup>ab</sup></i>	<i>984.99 ± 80.27<sup>ab</sup></i>
	24 °C	BMG	<i>3058.03 ± 548.48<sup>ab</sup></i>	<i>1707.2 ± 461.41<sup>a</sup></i>	<i>1376.4 ± 246.43<sup>a</sup></i>
		BMLac	<i>2003.37 ± 232.63<sup>cd</sup></i>	<i>1614.84 ± 572.81<sup>a</sup></i>	<i>1144.55 ± 356.52<sup>a</sup></i>
KM71 HGH22K-LAC	30 °C	BMG	<i>1054.77 ± 92.92<sup>ef</sup></i>	<i>363.87 ± 82.25<sup>c</sup></i>	<i>433.54 ± 49.84<sup>d</sup></i>
		BMLac	<i>920.51 ± 23.25<sup>ef</sup></i>	<i>362.8 ± 112.24<sup>c</sup></i>	<i>492.25 ± 59.71<sup>cd</sup></i>
	24 °C	BMG	<i>1455.41 ± 102.83<sup>de</sup></i>	<i>684.58 ± 284.37<sup>bc</sup></i>	<i>432.27 ± 84.85<sup>d</sup></i>
		BMLac	<i>718.97 ± 31.61<sup>f</sup></i>	<i>352.19 ± 85.20<sup>c</sup></i>	<i>525.52 ± 64.45<sup>bcd</sup></i>

Los datos de la cepa KM71FTEII-LAC se obtuvieron de los cultivos en los que se empleó BMM (no BMM-CaCl<sub>2</sub>) como medio de inducción.

Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Números en *italicas* indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con el resto de los tiempos de la misma condición.



**Figura 32.** Rendimiento de  $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa, en U/mgDCW, a las 0, 24 y 48 h de inducción de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en BMG y BMLac inicial. Las barras de error indican el error estándar. Letras iguales sobre las barras indican condiciones sin diferencia significativa dentro del mismo tiempo muestral: minúsculas en *itálicas* a las 0 h, minúsculas en **negritas** a las 24 h y mayúsculas a las 48 h.

Los rendimientos de  $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa mostraron una clara diferencia significativa entre las dos cepas bajo la misma condición de cultivo. En general, el rendimiento de F-L siempre fue mayor al de H-L en los tres tiempos de muestreo. Se presentó diferencia significativa entre las condiciones de cultivo de la cepa F-L a las 0 h, ya que el rendimiento fue mayor en los cultivos en BMG en comparación con los cultivos a la misma condición con BMLac inicial. Las cuatro condiciones de cultivo probadas para cada cepa no presentaron diferencias significativas en el rendimiento tanto a las 24 como a las 48 h de cultivo. La fuente de carbono inicial solo impactó el rendimiento de la cepa F-L a las 0 h, y en general, se presentó una disminución del rendimiento durante el metabolismo del metanol.

A las 0 h de inducción, existieron diferencias significativas de rendimiento entre las cepas y las fuentes de carbono iniciales ( $p \leq 0.01$ ), así como para la interacción entre cada par de las tres variables (cepa, temperatura y fuente de carbono) ( $p \leq 0.05$ ). A las 24 y 48 h la variable cepa fue significativa ( $p \leq 0.01$ ), y la temperatura ( $p \leq 0.05$ ) a las 48 h.

#### 7.2.2.4. Rendimiento de proteínas extracelulares totales y FTEII en sobrenadante de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII

Los datos de concentración de proteínas totales en sobrenadante de la cepa F-L y de la cepa control KM71FTEII, determinadas por los métodos de Bradford y BCA, se incluyen en la **Tabla 104** y la **Tabla 105** en el **Anexo 3**. Ya que la concentración varía con la biomasa, se usó el rendimiento de proteínas por biomasa en las comparaciones.

Los datos de rendimiento de proteínas extracelulares totales por unidad de biomasa, por el método de Bradford (**Tabla 82, Figura 33**), mostraron que en la cepa F-L no hubo diferencia significativa en el rendimiento a las 24 h entre las cuatro condiciones de inducción en BMM, ni entre las cuatro condiciones con BMM-CaCl<sub>2</sub>. A las 48 h, el rendimiento fue mayor en las condiciones inducidas con BMM-CaCl<sub>2</sub> que en BMM. El rendimiento de la condición de cultivo a 30 °C con BMLac inicial e inducción con BMM-CaCl<sub>2</sub> fue el más alto para F-L a las 24 y 48 h. Sin embargo, el rendimiento a las 24 y 48 h de la cepa KM71FTEII (cepa control sin genes *LAC*) a 30 °C fue mayor (al menos 1.5 veces) al del resto de las condiciones de F-L, indicando que la presencia de los genes *LAC* afectó negativamente el rendimiento durante la fase de inducción a 30 °C.

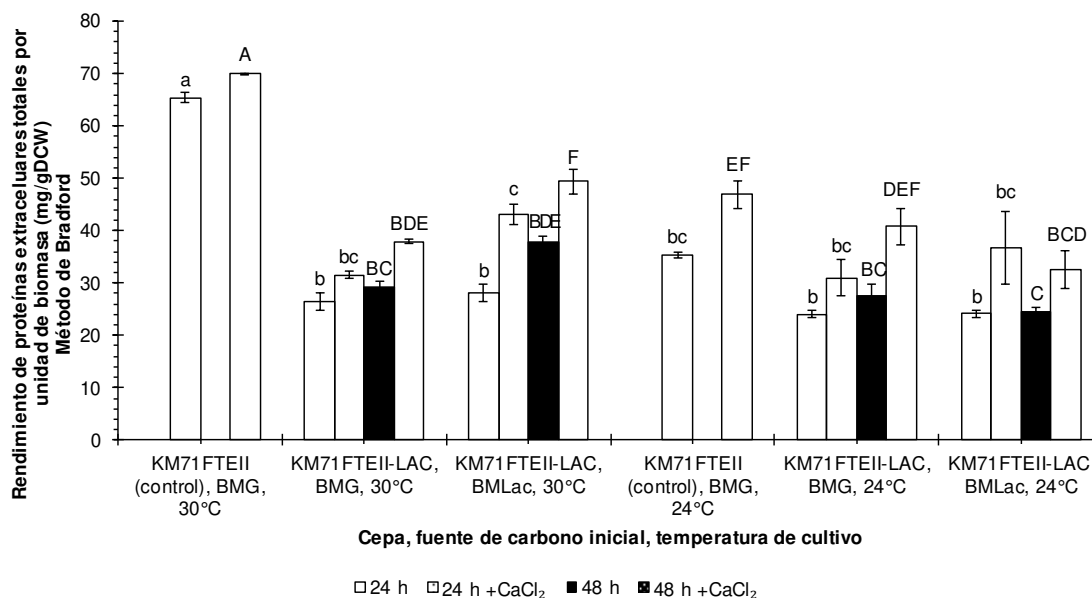
**Tabla 82.** Rendimiento de proteínas extracelulares producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 24 y 48 h de inducción, determinadas por el método de Bradford.

Cepa	Temperatura	Medio de generación de biomasa	Rendimiento de proteínas extracelulares totales por unidad de biomasa (mg/gDCW) - Método de Bradford	
			24 h	48 h
KM71 FTEII- LAC	30 °C	BMG	<u>26.37 ± 2.95<sup>a</sup></u>	<u>29.36 ± 1.72<sup>ab</sup></u>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	31.56 ± 1.29 <sup>ab</sup>	37.87 ± 0.71 <sup>acd</sup>
		BMLac	28.09 ± 2.92 <sup>a</sup>	37.81 ± 2.03 <sup>acd</sup>
		BMLac (+CaCl <sub>2</sub> )	<u>43.23 ± 3.37<sup>b</sup></u>	<u>49.44 ± 4.15<sup>c</sup></u>
	24 °C	BMG	<u>24.08 ± 1.19<sup>a</sup></u>	<u>27.56 ± 3.90<sup>ab</sup></u>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	<u>30.97 ± 6.10<sup>ab</sup></u>	<u>40.8 ± 5.95<sup>cde</sup></u>
		BMLac	<u>24.10 ± 1.17<sup>a</sup></u>	<u>24.64 ± 1.03<sup>b</sup></u>
		BMLac (+CaCl <sub>2</sub> )	<u>36.72 ± 11.97<sup>ab</sup></u>	<u>32.5 ± 6.17<sup>acb</sup></u>
KM71 FTEII	30 °C	BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	65.42 ± 1.61 <sup>c</sup>	70.09 ± 0.08 <sup>f</sup>
	24 °C	BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	35.39 ± 0.97 <sup>ab</sup>	46.88 ± 4.66 <sup>de</sup>

+CaCl<sub>2</sub>: empleo de BMM+CaCl<sub>2</sub> como medio de inducción.

Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Los datos de los dos tiempos de una misma condición son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) entre sí, excepto los subrayados, que no presentan diferencia significativa entre los mismos.



**Figura 33.** Rendimiento de proteínas extracelulares producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 24 y 48 h de inducción, determinadas por el método de Bradford. Las barras de error indican el error estándar. Letras iguales sobre las barras indican condiciones sin diferencia significativa en el mismo tiempo muestral: minúsculas a las 24 h y mayúsculas a las 48 h.

Los datos de rendimiento de proteínas extracelulares totales por unidad de biomasa, calculado por el método de BCA se incluyen en la **Tabla 106** del **Anexo 3**. Éstos mostraron rendimientos sin diferencia significativa entre las cuatro condiciones de cultivo de F-L. La excepción fue a las 48 h en los cultivos inducidos con BMM sin CaCl<sub>2</sub>, en los que la condición de cultivo a 24 °C en BMLac presentó un rendimiento significativamente menor a las otras tres condiciones.

La actividad de FTEII en los cultivos de inducción se calculó mediante el procedimiento descrito previamente (**6.3.3.8**) y a partir de esta determinación se calculó el rendimiento de producto por biomasa, en unidades de FTEII producidas por gDCW (U/gDCW). Los datos de actividad de FTEII por volumen de sobrenadante (U/mL) se incluyen en la **Tabla 107** en el **Anexo 3**, debido a que, a pesar de haber sido obtenidos de cultivos con densidades celulares similares, los rendimientos de FTEII normalizados por unidad de biomasa proporcionan una mejor comparación de las condiciones de cultivo.

El rendimiento de FTEII por unidad de biomasa (**Tabla 83**, **Figura 34**) más alto para la cepa F-L se registró en la condición 30 °C en BMLac inicial con inducción en BMM, a las 24 y 48 h. En general, no se encontró diferencia significativa entre los rendimientos obtenidos en BMM y BMM-CaCl<sub>2</sub> en la misma condición de cultivo y al

mismo tiempo de cultivo. Las únicas excepciones a lo anterior fueron las condiciones de 30 °C en BMLac inicial a las 48 h (mayor en BMM), y 24 °C en BMLac inicial a las 24 h (mayor en BMM-CaCl<sub>2</sub>). Los rendimientos más altos se presentaron en la cepa control KM71FTEII a 30 °C a las 24 y 48 h, siendo significativamente más altos que los de F-L en todas las condiciones de cultivo. Sin embargo, la condición de cultivo de F-L con mayor rendimiento a las 24 h (BMLac a 30 °C), no tuvo diferencias significativas con el rendimiento de la cepa control KM71FTEII a 24 °C a las 24 h. El hecho de que F-L tuviera rendimientos más bajos que la cepa control, puede indicar que la modificación genética con la inserción de los genes *LAC* afectó la producción de FTEII.

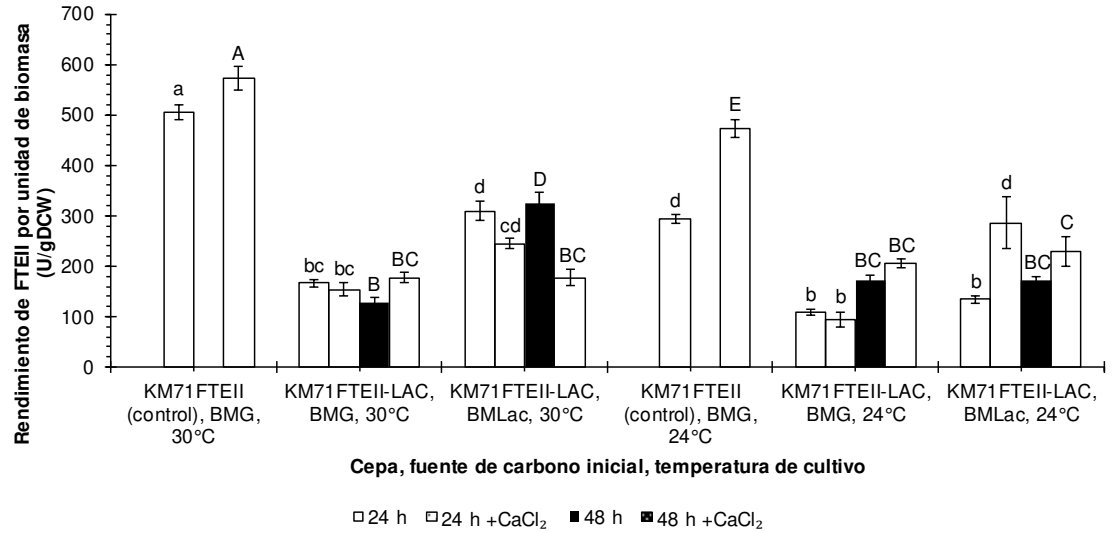
**Tabla 83.** Rendimiento de FTEII por unidad de biomasa de KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 24 y 48 h de inducción.

Cepa	Temperatura	Medio de generación de biomasa	Rendimiento de FTEII por unidad de biomasa (U/gDCW)	
			24 h	48 h
KM71FTEII-LAC	30 °C	BMG	166.07 ± 11.84 <sup>ab</sup>	127.03 ± 16.95 <sup>a</sup>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	<u>153.89 ± 23.31<sup>ab</sup></u>	<u>177.41 ± 18.71<sup>ab</sup></u>
		BMLac	<u>308.93 ± 33.06<sup>c</sup></u>	<u>323.46 ± 39.19<sup>c</sup></u>
		BMLac (+CaCl <sub>2</sub> )	245.14 ± 16.92 <sup>bc</sup>	177.09 ± 26.97 <sup>ab</sup>
	24 °C	BMG	108.70 ± 7.96 <sup>a</sup>	173.19 ± 16.27 <sup>a</sup>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	94.69 ± 25.97 <sup>a</sup>	205.77 ± 16.89 <sup>a</sup>
		BMLac	134.00 ± 11.52 <sup>a</sup>	171.26 ± 15.00 <sup>a</sup>
		BMLac (+CaCl <sub>2</sub> )	<u>286.44 ± 86.72<sup>c</sup></u>	<u>230.03 ± 50.54<sup>c</sup></u>
KM71FTEII	30 °C	BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	<u>505.58 ± 27.28<sup>d</sup></u>	<u>573.2 ± 41.96<sup>d</sup></u>
	24 °C	BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	293.89 ± 16.68 <sup>c</sup>	472.29 ± 29.42 <sup>c</sup>

+CaCl<sub>2</sub>: empleo de BMM+CaCl<sub>2</sub> como medio de inducción.

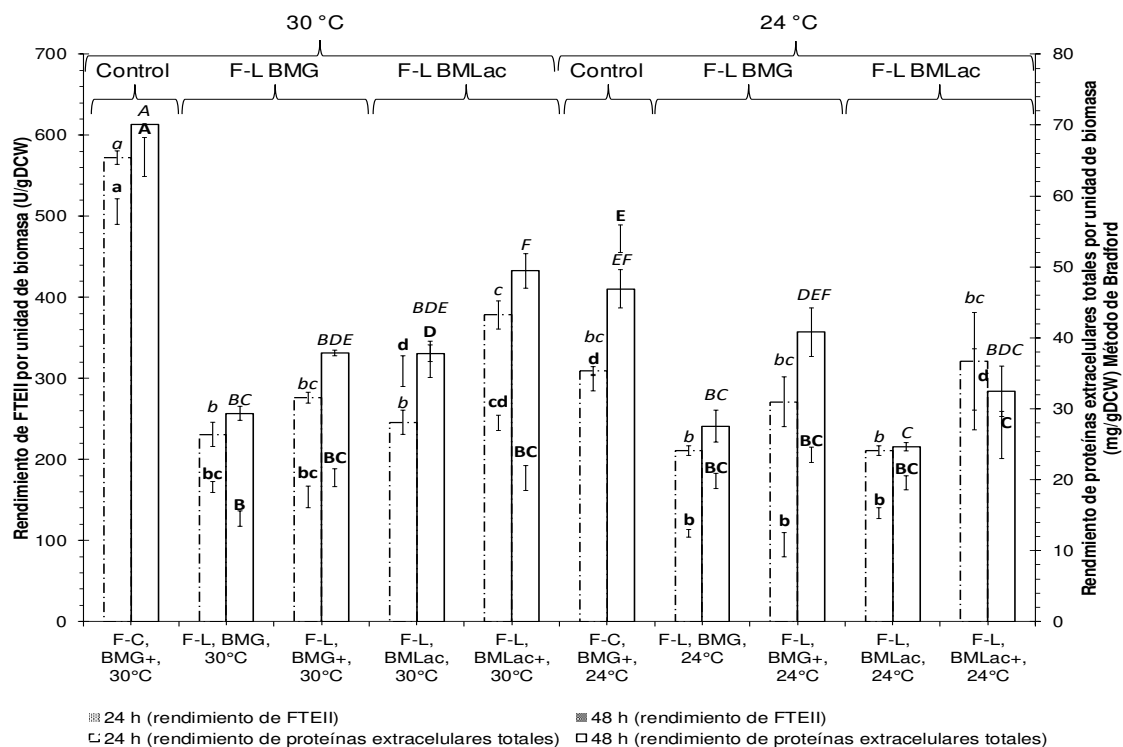
Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Los datos de los dos distintos tiempos de una misma condición son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ), excepto los subrayados, que no presentan diferencia significativa entre los mismos.



**Figura 34.** Rendimiento de FTEII por unidad de biomasa de KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 0, 24 y 48 h de inducción. Las barras de error indican el error estándar. Letras iguales sobre las barras indican condiciones sin diferencia significativa en el mismo tiempo muestral: minúsculas a las 24 h y mayúsculas a las 48 h.

El cálculo del coeficiente de correlación de los rendimientos de proteínas extracelulares totales por biomasa con los rendimientos de FTEII por biomasa, calculado con los datos a las 24 y 48 h para las determinaciones con Bradford y BCA, mostró que los datos obtenidos con Bradford tuvieron una correlación más alta con los rendimientos de proteínas extracelulares totales que los obtenidos con BCA, con coeficientes de correlación  $r = 0.77$  para Bradford y  $r = 0.61$  para BCA. La comparación del rendimiento de proteínas extracelulares totales (Bradford) y de FTEII por unidad de biomasa de cada condición (**Figura 35**) mostró que a pesar de que la cepa F-L obtuvo rendimientos de proteína extracelular similares a la cepa control (a 24 °C), los rendimientos de FTEII de la cepa control fueron significativamente mayores.



**Figura 35.** Comparación de los rendimientos de FTEII por unidad de biomasa, y de proteínas extracelulares totales (Bradford) por unidad de biomasa, a las 24 y 48 h de inducción de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII (control). BMG+ o BMLac+: Inducción en medio BMM+CaCl<sub>2</sub>. Las barras de error indican el error estándar. Las letras en itálicas comparan el rendimiento de proteínas extracelulares totales: en minúsculas a las 24 h y en mayúsculas a las 48 h. Las letras en negritas comparan el rendimiento de FTEII: en minúsculas a las 24 h y en mayúsculas a las 48 h.

Los resultados de los análisis estadísticos de las concentraciones y rendimientos de proteínas extracelulares totales y FTEII en sobrenadante de las cepas F-L y KM71FTEII, realizados de acuerdo con los diseños experimentales descritos en el apartado 6.3.3.11, se muestran en la **Tabla 84**.

**Tabla 84.** Análisis estadísticos de los rendimientos de proteínas extracelulares totales y FTEII en sobrenadante de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII.

Parámetro evaluado	h	Primer diseño experimental			Segundo diseño experimental						
		F		IF	F			IF			
		C	T	C T	FC	T	Ca	FC T	FC Ca	T Ca	FC T Ca
Rendimiento de proteína extracelular por unidad de biomasa (Bradford)	24	**	**	**	*	NS	**	NS	NS	NS	NS
	48	**	*	**	NS	**	**	**	NS	NS	NS
Rendimiento de FTEII por unidad de biomasa	24	**	**	**	**	**	NS	NS	NS	**	**
	48	**	NS	**	**	NS	NS	**	**	**	**

h: tiempo de inducción en horas, F: factor, IF: interacciones entre factores, C: factor cepa, T: factor temperatura, FC: factor fuente de carbono inicial, Ca: factor CaCl<sub>2</sub> en medio de inducción.

\*\* : altamente significativo ( $p \leq 0.01$ ), \* : significativo ( $p \leq 0.05$ ), NS: no significativo.

### 7.2.2.5. Rendimientos de proteínas extracelulares totales y hGH en sobrenadante de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K

Los datos de concentración de proteínas totales en sobrenadante de la cepa H-L y de la cepa control KM71HGH22K se incluyen en la **Tabla 108** del **Anexo 3**. Debido a que la concentración de proteínas varía en función de la biomasa, se usará el rendimiento de proteínas extracelulares totales por biomasa para comparar las condiciones de cultivo y no la concentración de proteínas totales en sobrenadante.

El rendimiento de proteínas extracelulares totales producidas por unidad de biomasa, determinado por el método de Bradford (**Tabla 85, Figura 36**), en H-L cultivada a 30 °C en BMLac inicial fue significativamente mayor al resto de las condiciones (hasta 3.5 veces a las 24 h y 2.3 veces a las 48 h). El menor rendimiento lo obtuvo la cepa control KM71HGH22K a 24 °C a las 24 h.

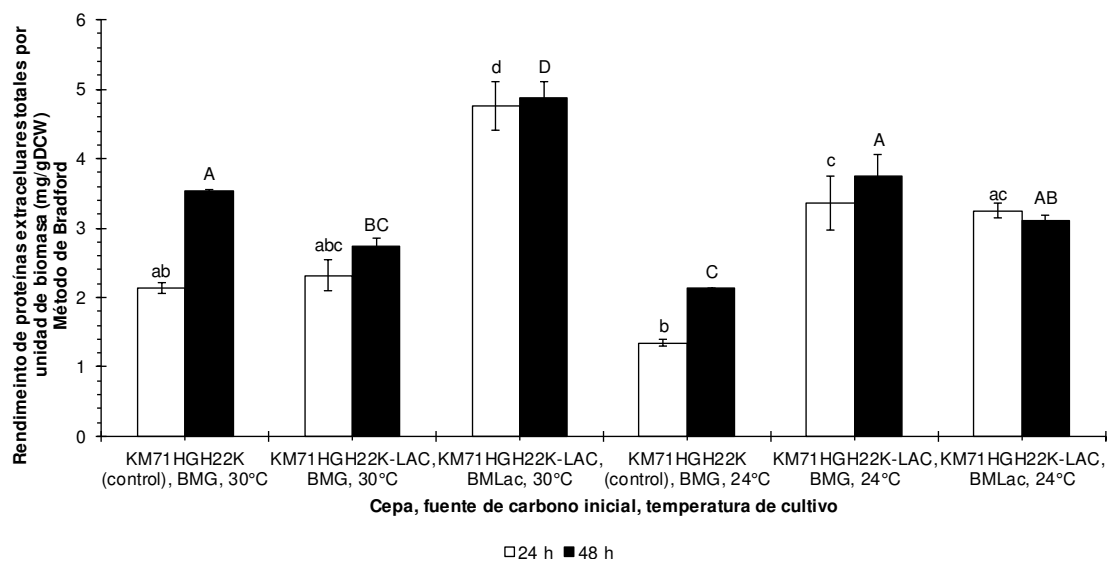
**Tabla 85.** Rendimiento de proteínas extracelulares producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción, determinado por el método de Bradford.

Cepa	Tempe- ratura	Medio de generación de biomasa	Rendimiento de proteínas extracelulares totales por unidad de biomasa (mg/gDCW) Método de Bradford		
			0 h	24 h	48 h
KM71HGH22K- LAC	30 °C	BMG	3.70 ± 0.50 <sup>a</sup>	<u>2.32 ± 0.39<sup>abc</sup></u>	<u>2.74 ± 0.20<sup>ab</sup></u>
		BMLac	8.56 ± 0.78 <sup>b</sup>	<u>4.77 ± 0.61<sup>d</sup></u>	<u>4.88 ± 0.41<sup>c</sup></u>
	24 °C	BMG	<u>4.65 ± 2.11<sup>a</sup></u>	<u>3.36 ± 0.67<sup>c</sup></u>	<u>3.76 ± 0.52<sup>d</sup></u>
		BMLac	10.51 ± 2.40 <sup>b</sup>	<u>3.25 ± 0.18<sup>ac</sup></u>	<u>3.11 ± 0.14<sup>ad</sup></u>
KM71HGH22K	30 °C	BMG	1.24 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.14 ± 0.13 <sup>ab</sup>	3.54 ± 0.03 <sup>d</sup>
	24 °C	BMG	<u>1.45 ± 0.11<sup>a</sup></u>	<u>1.35 ± 0.09<sup>ac</sup></u>	2.13 ± 0.02 <sup>b</sup>

Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Los datos de los tres distintos tiempos de una misma condición son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ), excepto los subrayados, que no presentan diferencia significativa entre los mismos.





**Figura 36.** Rendimiento de proteínas extracelulares totales producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 24 y 48 h de inducción, determinado por el método de Bradford. Las barras de error indican el error estándar. Letras iguales sobre las barras indican condiciones sin diferencia significativa en el mismo tiempo muestral: minúsculas a las 24 h y mayúsculas a las 48 h.

Los valores de rendimiento más altos de proteínas extracelulares totales producidas por unidad de biomasa, determinado por el método de BCA (**Tabla 86, Figura 37**), se obtuvieron cultivando a H-L a 30 °C en BMLac inicial ( $21.96 \pm 1.72$  mg/gDCW a las 24 h y  $34.29 \pm 5.52$  a las 48 h mg/gDCW), siendo significativamente distinta al resto de las condiciones y cepas (hasta 3.5 y 2.3 mayor a las 24 y 48 h, respectivamente). Los valores de rendimiento más bajos los obtuvo la cepa control cultivada a 24 °C ( $3.39 \pm 0.08$  mg/gDCW a las 24 h y  $13.55 \pm 0.4$  mg/gDCW a las 48 h) respecto a todas las condiciones evaluadas comparando con los valores obtenidos al mismo tiempo de cultivo. Los resultados de las condiciones de con rendimientos más altos o bajos de proteína extracelular por unidad de biomasa fueron iguales en los métodos de Bradford y BCA. Sin embargo, las diferencias del rendimiento entre las 24 y 48 h fueron distintas según el método empleado, siendo el método de Bradford el que obtuvo menor diferencia entre ambos tiempos.

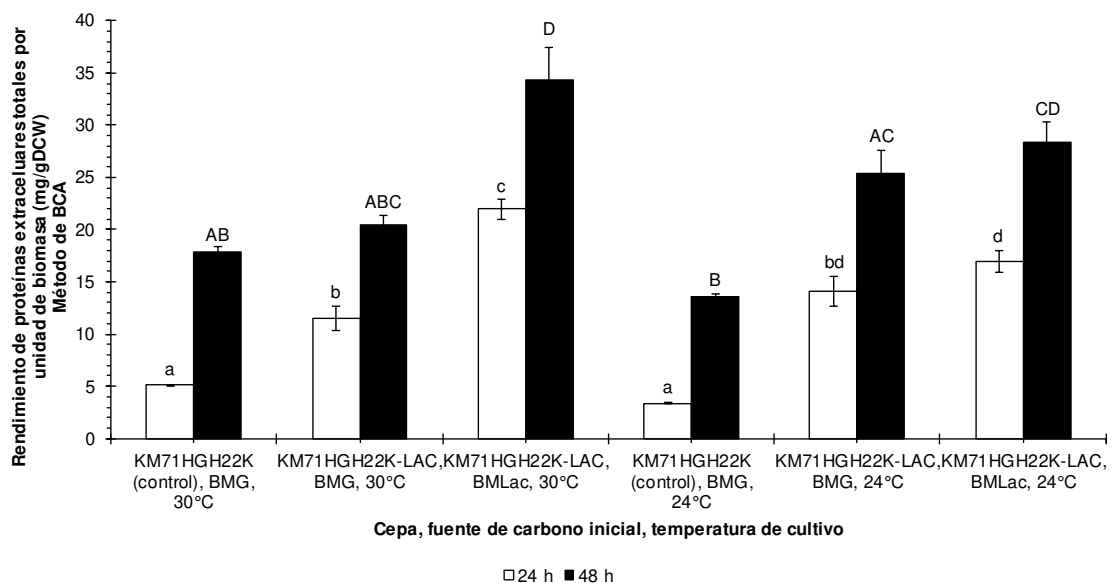
**Tabla 86.** Rendimiento de proteínas extracelulares producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción, determinado por el método BCA.

Cepa	Temperatura	Medio de generación de biomasa	Rendimiento de proteínas extracelulares totales por unidad de biomasa (mg/gDCW)		
			Método de BCA		
			0 h	24 h	48 h
KM71HGH22K-LAC	30 °C	BMG	ND	11.52 ± 2.10 <sup>a</sup>	20.43 ± 1.53 <sup>abc</sup>
		BMLac	ND	21.96 ± 1.72 <sup>b</sup>	34.29 ± 5.52 <sup>d</sup>
	24 °C	BMG	ND	14.08 ± 2.53 <sup>ac</sup>	25.37 ± 3.76 <sup>ac</sup>
		BMLac	ND	16.90 ± 1.78 <sup>c</sup>	28.40 ± 3.20 <sup>cd</sup>
KM71HGH22K	30 °C	BMG	1.09 ± 0.13 <sup>a</sup>	5.08 ± 0.22 <sup>d</sup>	17.88 ± 0.87 <sup>ab</sup>
	24 °C	BMG	1.33 ± 0.26 <sup>a</sup>	3.39 ± 0.08 <sup>d</sup>	13.55 ± 0.40 <sup>b</sup>

ND: no determinado.

Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Los datos de los tres tiempos de una misma condición son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) entre sí.



**Figura 37.** Rendimiento de proteínas extracelulares totales producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 24 y 48 h de inducción, determinado por el método de BCA. Las barras de error indican el error estándar. Letras iguales sobre las barras indican condiciones sin diferencia significativa en el mismo tiempo muestral: minúsculas a las 24 h y mayúsculas a las 48 h.

El rendimiento más alto de hGH por unidad de biomasa (**Tabla 87, Figura 38**), tanto a las 24 como a las 48 h, lo obtuvo la condición de cultivo de la cepa H-L a 30 °C en BMLac inicial ( $665.08 \pm 76.09 \mu\text{g/gDCW}$  a las 24 h y  $1345.31 \pm 289.67 \mu\text{g/gDCW}$  a las 48 h), sin diferencia significativa a las 24 h con la condición a 24 °C en BMLac inicial, y a las 48 h con H-L a 24 °C en BMG inicial. La condición con menor rendimiento la

presentó la cepa H-L a 30 °C en BMG inicial ( $95.8 \pm 6.66 \mu\text{g/gDCW}$  a las 24 h y  $167.96 \pm 6.33 \mu\text{g/gDCW}$  a las 48 h, respectivamente). A las 0 y 24 h, los cultivos en BMLac inicial presentaron rendimientos significativamente mayores a los del resto de las condiciones evaluadas a ese mismo tiempo muestral.

**Tabla 87.** Rendimiento de hGH por unidad de biomasa de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción.

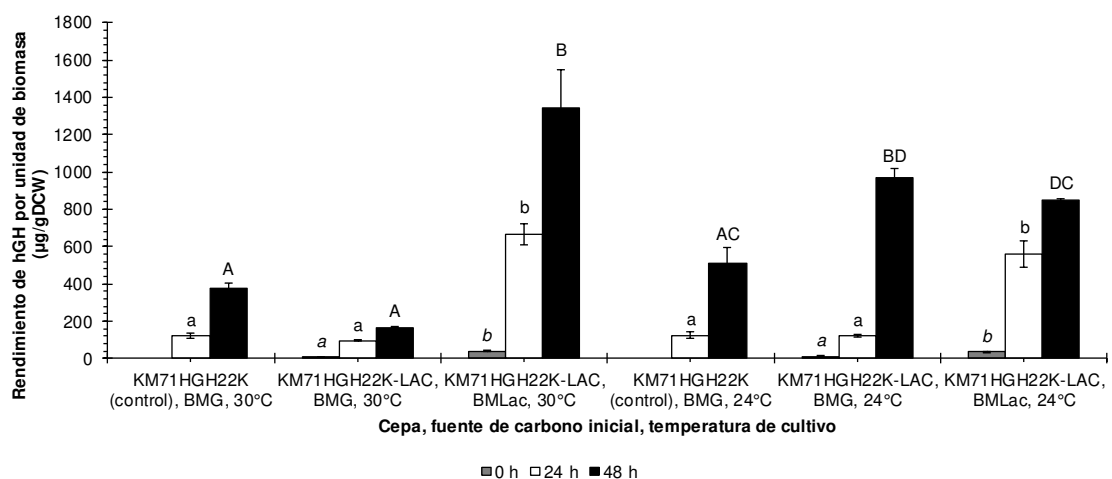
Cepa	Tempe- ratura	Medio de generación de biomasa	Rendimiento de hGH por unidad de biomasa ( $\mu\text{g/gDCW}$ )		
			0 h	24 h	48 h
KM71HGH22K- LAC	30 °C	BMG	$10.45 \pm 1.53^a$	$95.8 \pm 6.66^a$	$167.96 \pm 6.33^a$
		BMLac	$39.59 \pm 5.77^b$	$665.08 \pm 76.09^b$	$1345.31 \pm 289.67^b$
	24 °C	BMG	$12.06 \pm 2.52^a$	$122.03 \pm 9.5^a$	$970.83 \pm 68.83^{bc}$
		BMLac	$35.99 \pm 6.38^b$	$563.05 \pm 99.77^b$	$850.73 \pm 11.82^{cd}$
KM71HGH22K	30 °C	BMG	ND	$121.76 \pm 24.15^a$	$373.39 \pm 53.54^a$
	24 °C	BMG	ND	$125.83 \pm 36.2^a$	$507.7 \pm 156.84^{ad}$

ND: no determinado.

Los datos de 24 y 48 h de la cepa KM71HGH22K-LAC se obtuvieron eliminando un dato de los triplicados para reducir la variación. El resto de los datos se obtuvo por triplicado.

Los datos muestran el promedio de triplicados o duplicados, y su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Los datos de los tres tiempos de una misma condición son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) entre sí.

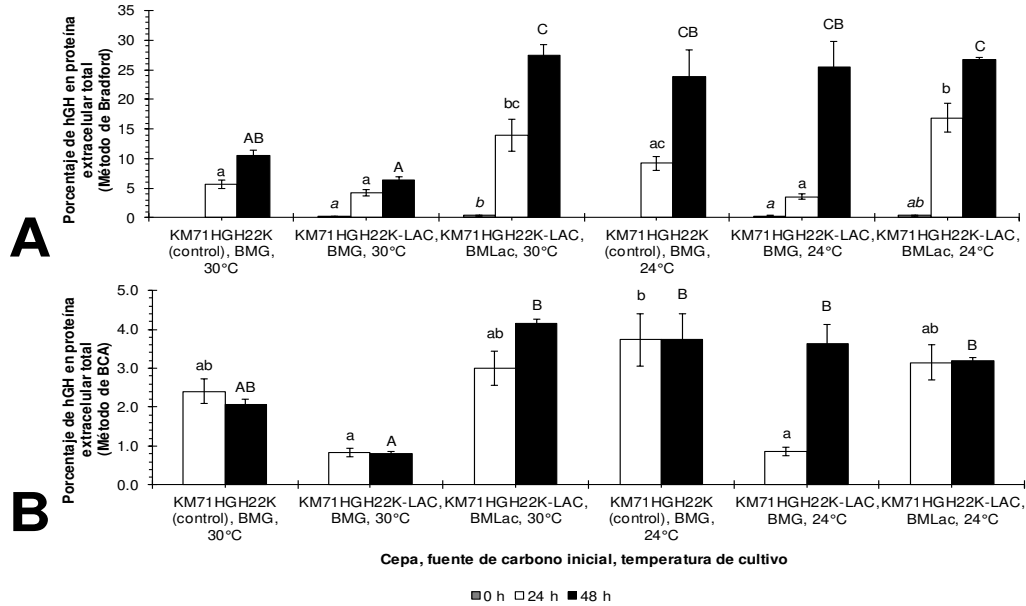


**Figura 38.** Rendimiento de hGH por unidad de biomasa de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción. Las barras de error indican el error estándar. Letras iguales sobre las barras indican condiciones sin diferencia significativa en el mismo tiempo muestral: minúsculas a las 0 h, minúsculas no itálicas a las 24 h y mayúsculas a las 48 h.

El rendimiento de producto (hGH o FTEII) por unidad de biomasa en la cepa KM71HGH22K-LAC tuvo un comportamiento distinto al de la cepa KM71FTEII-LAC, en relación con los rendimientos obtenidos respecto a sus cepas control. Mientras que los rendimientos resultaron más bajos en KM71FTEII-LAC que en KM71FTEII, lo contrario ocurrió con la cepa KM71HGH22K-LAC, ya que logró superar los rendimientos obtenidos por la cepa KM71HGH22K. Es probable que lo anterior se deba a la inserción no controlada de los genes heterólogos en distintas regiones del genoma de *P. pastoris*, lo cual afectaría su expresión en función de las regiones genómicas adyacentes. Ya que la inserción de los genes es aleatoria, su regulación presentará variaciones.

Los datos de concentración de hGH por volumen de sobrenadante se incluyen en la **Tabla 109** en el **Anexo 3**, debido a que, a pesar de haber sido obtenidos de cultivos con densidades celulares similares, los rendimientos de hGH normalizados por unidad de biomasa proporcionan una mejor comparación de las condiciones de cultivo.

El porcentaje de hGH en proteína extracelular total considerando la determinación de proteínas extracelulares por el método de Bradford (**Figura 39**, panel A), fue más alto a las 24 h en la cepa H-L cultivada en BMLac inicial a 24 °C ( $16.91 \pm 3.56$  %), y a las 48 h en la cepa H-L cultivada en BMLac inicial a 30 °C ( $27.42 \pm 2.69$  %). El menor porcentaje lo obtuvieron las condiciones de H-L en BMG inicial a 24 °C a las 24 h ( $3.54 \pm 0.61$  %) y H-L en BMG inicial a 30 °C a las 48 h ( $6.35 \pm 0.73$  %). El porcentaje de hGH en proteína extracelular total con los datos obtenidos por el método de BCA (**Figura 39**, panel B), fue más alto en la cepa KM71HGH22K a 24 °C en BMG inicial a las 24 h ( $3.73 \pm 1.17$  %), y en la cepa H-L a 30 °C en BMLac inicial a las 48 h ( $4.17 \pm 0.14$  %). La cepa H-L a 30 °C en BMG inicial presentó el menor porcentaje a 24 y 48 h ( $0.83 \pm 0.15$  y  $0.80 \pm 0.08$  %). Ambos métodos reflejan porcentajes diferentes debido a la sensibilidad de las técnicas. Sin embargo, en ambos se observó que la condición de cultivo con el porcentaje de hGH en proteína extracelular total más alto fue la de H-L en BMLac inicial a 30 °C a las 48 h.



**Figura 39.** Porcentaje de hGH en proteína extracelular, determinado por los métodos de Bradford (A) y BCA (B), de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción. Las barras de error indican el error estándar. Letras iguales sobre las barras indican condiciones sin diferencia significativa en el mismo tiempo muestral: minúsculas *italicas* a las 0 h, minúsculas no *italicas* a las 24 h y mayúsculas a las 48 h. Los datos de los tiempos de una misma condición son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) entre sí.

Los resultados de los análisis estadísticos de las concentraciones y rendimientos de proteínas extracelulares totales y hGH en sobrenadante de las cepas H-L y KM71HGH22K, realizados de acuerdo con los diseños experimentales descritos en el apartado **6.3.3.11**, se muestran en la **Tabla 88**.

**Tabla 88.** Análisis estadísticos de las concentraciones y rendimientos de proteínas extracelulares totales y hGH en sobrenadante de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K.

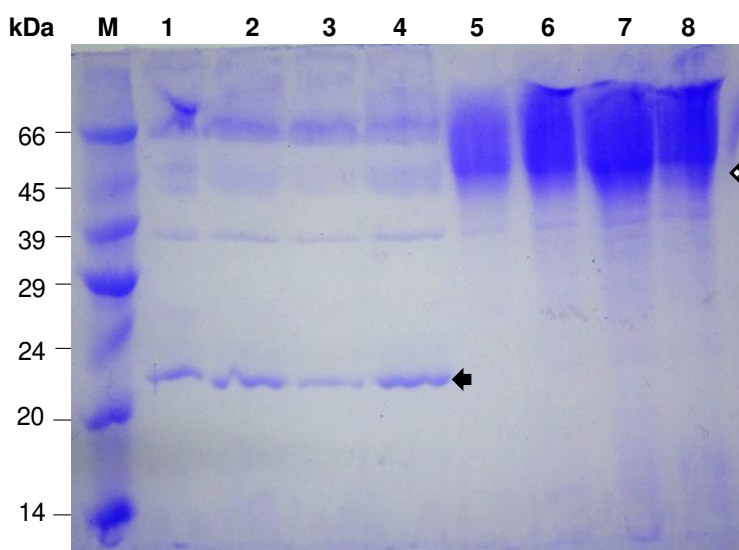
Parámetro evaluado	h	Primer diseño experimental			Segundo diseño experimental		
		F	IF	C	F	T	FC
Rendimiento de proteína extracelular por unidad de biomasa (Bradford)	24	**	NS	**	**	NS	**
	48	*	NS	**	**	NS	**
Rendimiento de proteína extracelular por unidad de biomasa (BCA)	24	**	NS	NS	**	NS	*
	48	**	NS	**	**	NS	*
Rendimiento de hGH por unidad de biomasa	24	NS	NS	NS	**	NS	NS
	48	NS	**	**	**	NS	*
Porcentaje de hGH en proteína extracelular (Bradford)	24	**	**	NS	**	NS	NS
	48	NS	**	NS	*	NS	NS
Porcentaje de hGH en proteína extracelular (BCA)	24	**	NS	NS	**	NS	NS
	48	NS	**	NS	**	**	**

h: tiempo de inducción en horas, F: factor, IF: interacciones entre factores, C: factor cepa, T: factor temperatura, FC: factor fuente de carbono inicial.

\*\* : altamente significativo ( $p \leq 0.01$ ), \* : significativo ( $p \leq 0.05$ ), NS: no significativo.

### 7.2.2.6. Análisis por SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivos de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC

El análisis por SDS-PAGE de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71FTEII-LAC a las 48 h (**Figura 40**) confirmó la producción y secreción de la proteína heteróloga en todas las condiciones de cultivo, independientemente de la fuente de carbono inicial empleada. En la **Tabla 89** se indica la distribución de las muestras de proteínas, así como la cantidad de proteína aplicada en el gel determinada por los métodos de Bradford y BCA.



**Figura 40.** Análisis de sobrenadantes de las 48 h de inducción por SDS-PAGE. Las muestras aplicadas en cada carril se mencionan en la **Tabla 89**. Se indica con flechas la ubicación de las proteínas heterólogas hGH (flecha negra) y FTEII (flecha blanca). M: marcador de peso molecular.

**Tabla 89.** Distribución de las muestras de proteínas y cantidad aplicada en el análisis de sobrenadantes de las 48 h de inducción por SDS-PAGE.

Cepa	Temperatura	Medio de cultivo inicial	Carril	Conc.	Vol.	Proteína extracelular aplicada ( $\mu\text{g}$ )	
						Bradford	BCA
KM71HGH22K-LAC	30°C	BMG	1	25	10	7.016	55.234
		BMLac	2	20	8.5	7.098	55.972
	24°C	BMG	3	20	9.7	7.040	50.728
		BMLac	4	33.33	7.6	7.000	56.004
KM71FTEII-LAC	30°C	BMG	5	1.25	7.3	3.565	210.886
		BMLac	6	1.25	7.1	3.502	178.846
	24°C	BMG	7	1.25	10	3.470	213.435
		BMLac	8	1.25	10	3.112	184.563

Proteína extracelular aplicada: calculada con el volumen de muestra concentrado aplicado y la concentración según los dos métodos de determinación.

Conc.: factor de concentración de la muestra aplicada respecto al sobrenadante original.

Vol.: volumen de muestra concentrada aplicado en el gel.

### 7.2.3. Evaluación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de genes regulados por los promotores *AOX1* y *GAP*, y de otros genes relacionados

#### 7.2.3.1. Muestras empleadas en la evaluación

Las muestras de cDNA obtenidas mediante RT de los RNA extraídos, por cada cepa y condición de cultivo, se presentan en la **Tabla 90**. Los parámetros de calidad de cada muestra de RNA se presentan detalladamente en el **Anexo 4**. No fue posible obtener cDNAs de ciertas condiciones de cultivo debido a que las muestras de RNA obtenidas no cumplieron con los criterios de calidad (mencionados en **6.3.4.3**) y a falta de reactivos.

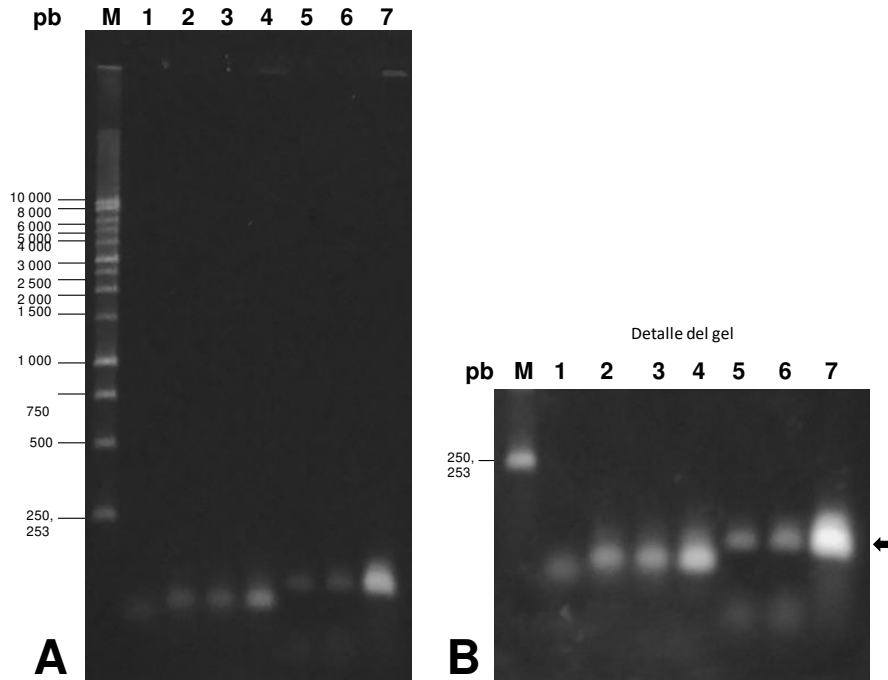
**Tabla 90.** Número de muestras de cDNA obtenidas por cada condición de análisis.

	KM71FTEII-LAC				KM71FTEII	
	30 °C		24 °C		30 °C	24 °C
	BMG	BMLac	BMG	BMLac	BMG	BMG
0 h	1	1	1	1	(2)	(2)
24 h	1	1	1	1	(1)	(1)
48 h	2 (1)	2	(1)	2 (1)	0	0
	KM71HGH22K-LAC				KM71HGH22K	
	30 °C		24 °C		30 °C	24 °C
	BMG	BMLac	BMG	BMLac	BMG	BMG
0 h	2	2	1	1	1	1
24 h	2	1	1	1	0	1
48 h	2	3	2	2	1	0

Los números entre paréntesis indican muestras obtenidas de cultivos con inducción en BMM+CaCl<sub>2</sub>

#### 7.2.3.2. Verificación de oligonucleótidos diseñados para qPCR de la región *aox1::ARG4*

El análisis por electroforesis de las PCR con los oligonucleótidos 5qAOX1ARG4 y 3qAOX1ARG4 (**6.3.4.6.2**) mostró que éstos fueron capaces de generar un producto amplificado de tamaño aproximado al esperado de 106 pb en las reacciones de PCR con cDNA derivados de la cepa KM71HGH22K-LAC, y en la preparación directa de DNA genómico de una colonia de KM71pPIC9 (**Figura 41**). Asimismo, el análisis por electroforesis de las PCR con los oligonucleótidos 5qG6PD y 3qG6PD mostró un producto amplificado cercano al esperado de 68 pb y de tamaño menor al producto amplificado en las PCR con los oligonucleótidos qAOX1ARG4, comprobando la amplificación en muestras de cDNA. De esa manera, se comprobó la transcripción de *aox1::ARG4* de las cepas KM71 de *P. pastoris* a pesar de la inserción del gen *ARG4*, el cual tiene su propio promotor en dirección opuesta al que tiene *AOX1*.



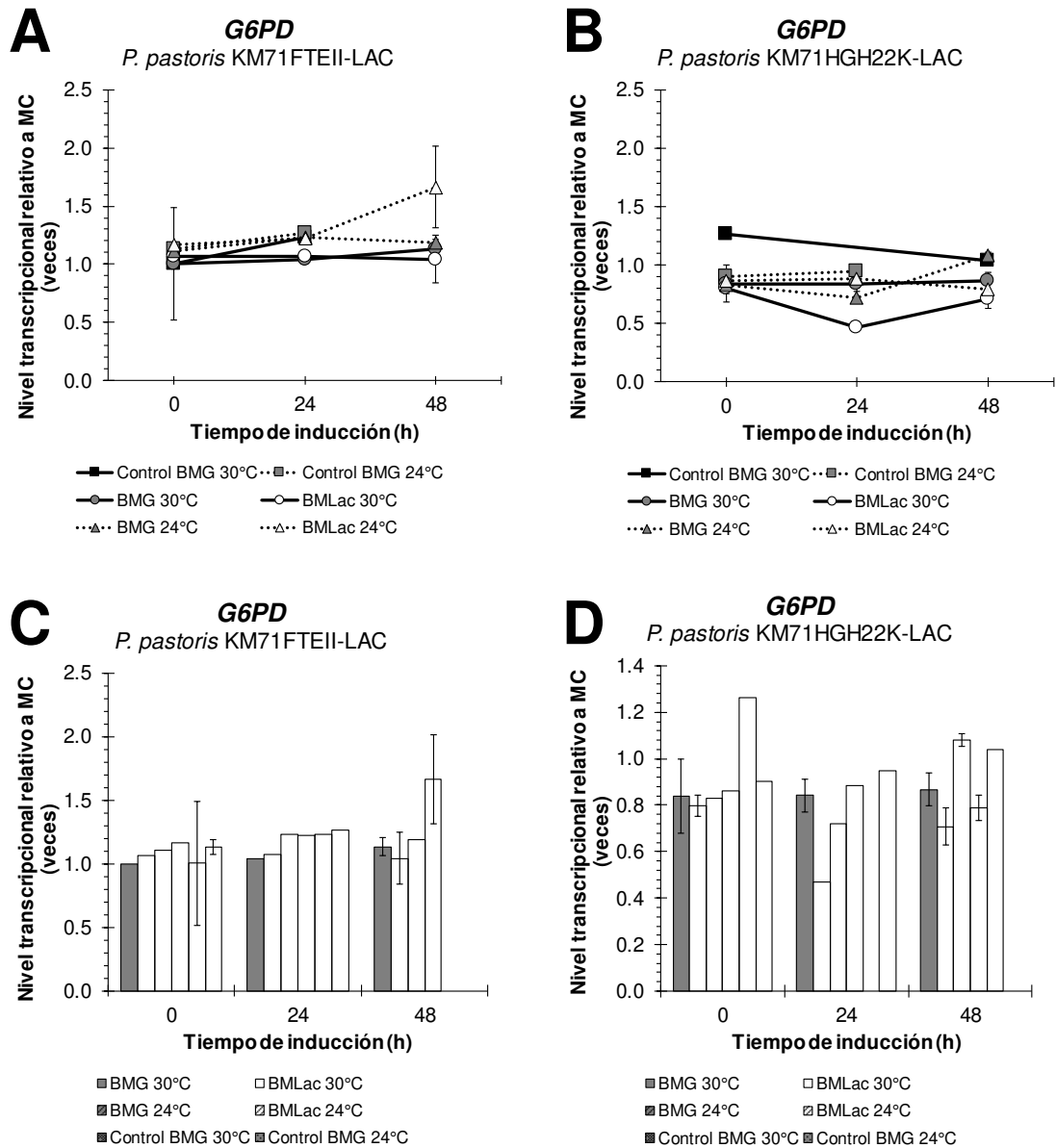
**Figura 41.** Verificación por PCR de los oligonucleótidos para qPCR dirigidos al transcrito *aox1::ARG4* en cepas de *P. pastoris* KM71. A) Los carriles 1 a 4 corresponden a PCR con la mezcla de oligonucleótidos qG6PD (tamaño esperado: 68 pb), los carriles 5 a 6 corresponden a PCR con la mezcla de oligonucleótidos qAOX1ARG4 (tamaño esperado: 106 pb). Carril M: Marcador 1 kb Ladder (Promega). Carril 1: PCR del control negativo de retrotranscripción del RNA de H-L 24 °C BMLac 48 h (matraz 1) (6 µL). Carriles 2 y 5: PCR del cDNA de H-L 24 °C BMG 48 h (matraz 1) (6 µL). Carriles 3 y 6: PCR del cDNA de H-L 24 °C BMLac 48 h (matraz 1) (6 µL). Carriles 4 y 7: PCR del DNA obtenido directamente de una colonia de KM71pPIC9 tratada con liticasa (6 µL). B) Detalle del gel anterior.

### 7.2.3.3. Niveles transcripcionales de los genes evaluados

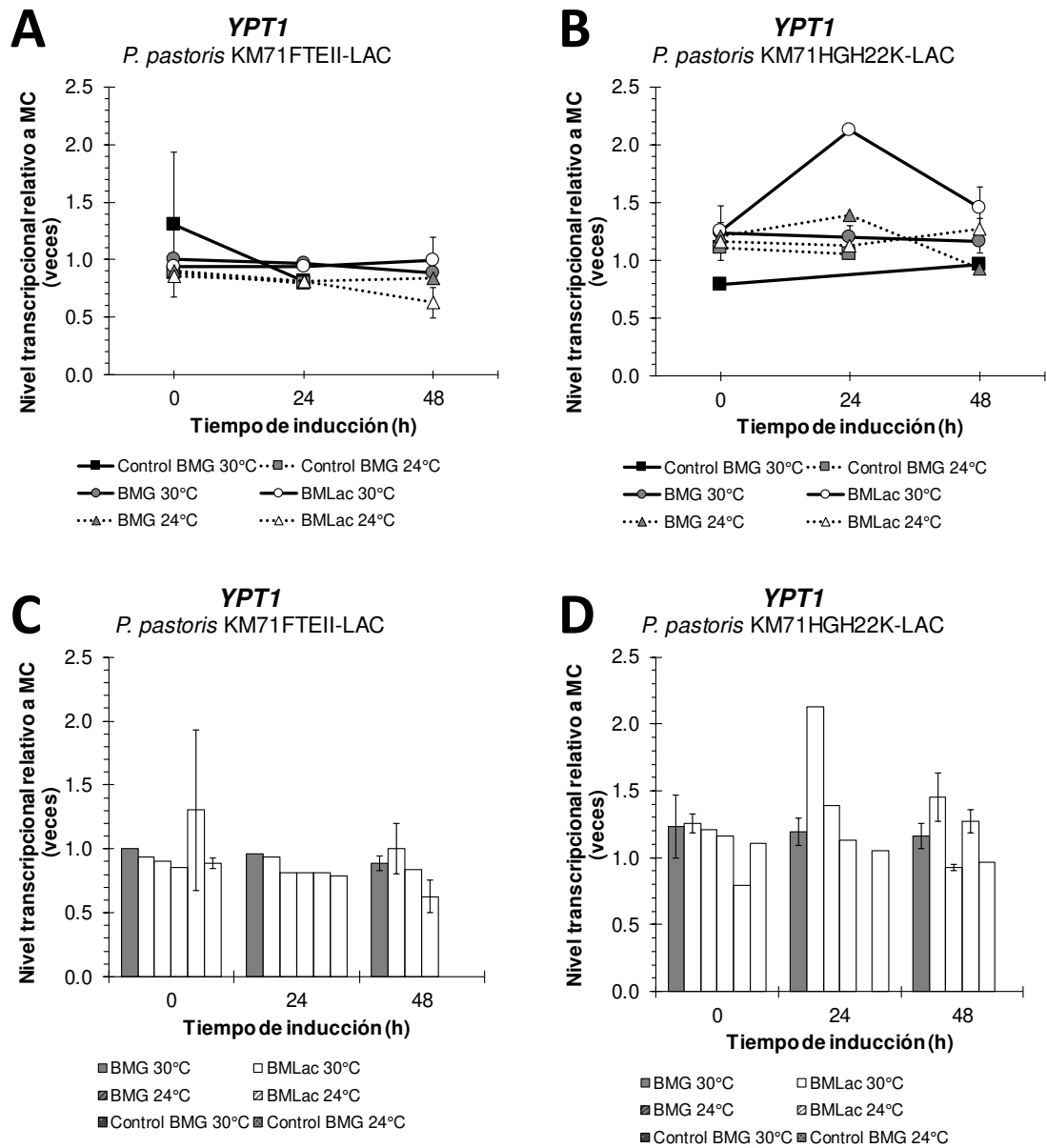
Se empleará el término gen para referirse a las secuencias heterólogas, que no presentan la secuencia original de su organismo de origen, sino que están modificadas para optimizar la producción en *P. pastoris*, por ejemplo, *LAC4*, *FTEII* y *HGH*.

Los niveles transcripcionales de los genes normalizadores *G6PD* y *YPT1* (**Figura 42** y **Figura 43**, respectivamente) no presentaron valores superiores al doble o inferiores a la mitad de la muestra calibradora en la mayoría de las condiciones evaluadas. La única muestra que obtuvo una variación relativamente alta respecto a la muestra calibradora fue la de la cepa KM71HGH22K-LAC cultivada a 30 °C en BMLac inicial tanto para el gen *G6PD* como para el gen *YPT1*. Debido a que algunas condiciones de cultivo solo tienen un replicado de muestra, se podría decir que esto se debe a la variación experimental.





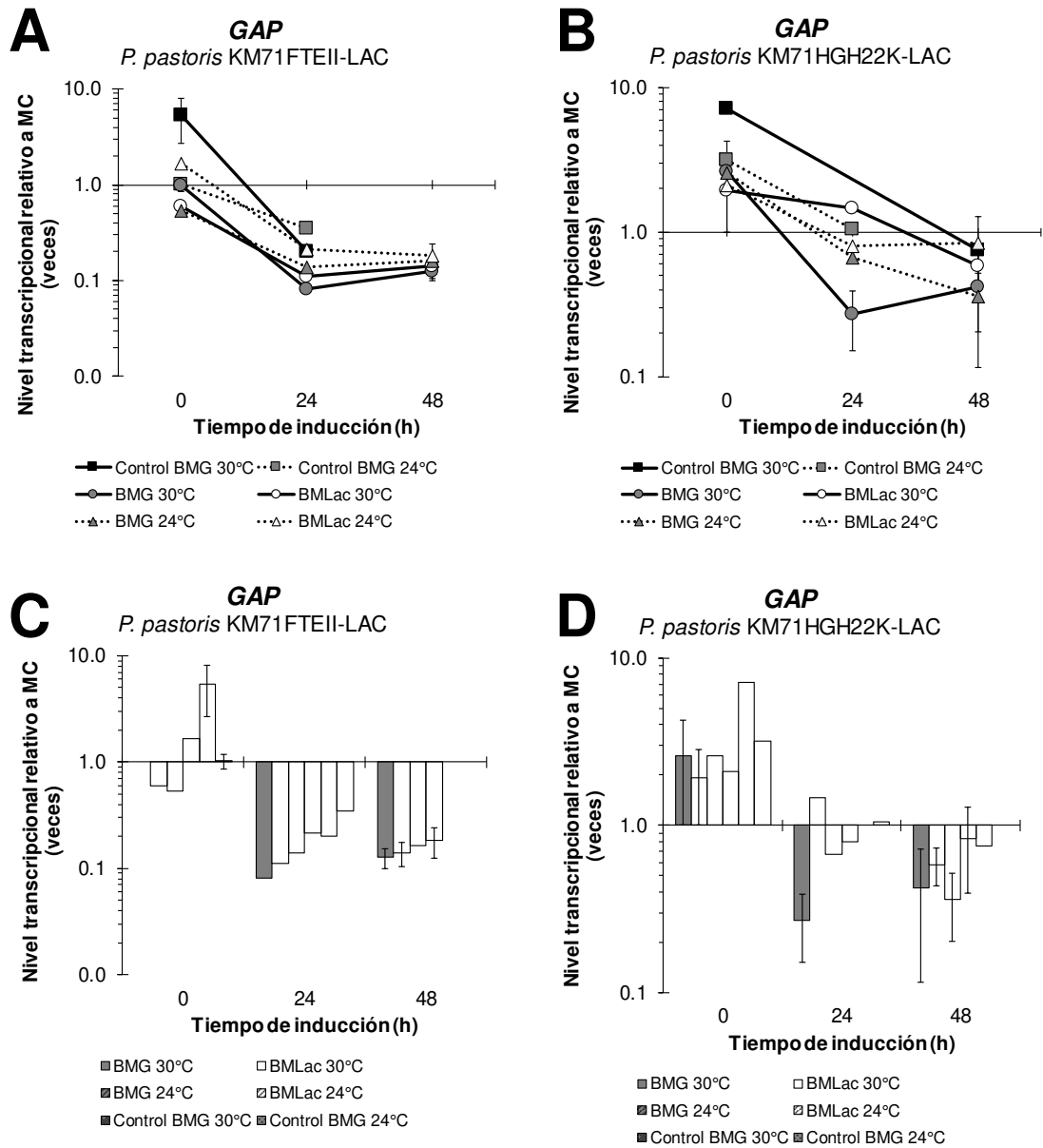
**Figura 42.** Niveles transcripcionales del gen normalizador *G6PD* a las 0, 24 y 48 h de inducción. A) y C) Cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII (control) a distintas condiciones de cultivo. B) y D) Cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K (control) a distintas condiciones de cultivo. MC: muestra calibradora (BMG 30 °C 0 h de KM71FTEII-LAC para KM71FTEII-LAC y KM71FTEII, y BMG 30 °C 0 h de KM71HGH22K-LAC para KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K). Las barras de error muestran el error estándar de las condiciones evaluadas con duplicados o triplicados biológicos. Se omiten las siguientes condiciones: KM71FTEII en BMG inicial a 30 °C y a 24 °C a las 48 h, KM71HGH22K en BMG inicial a 30 °C a las 24 h y en BMG inicial a 24 °C a las 48 h.



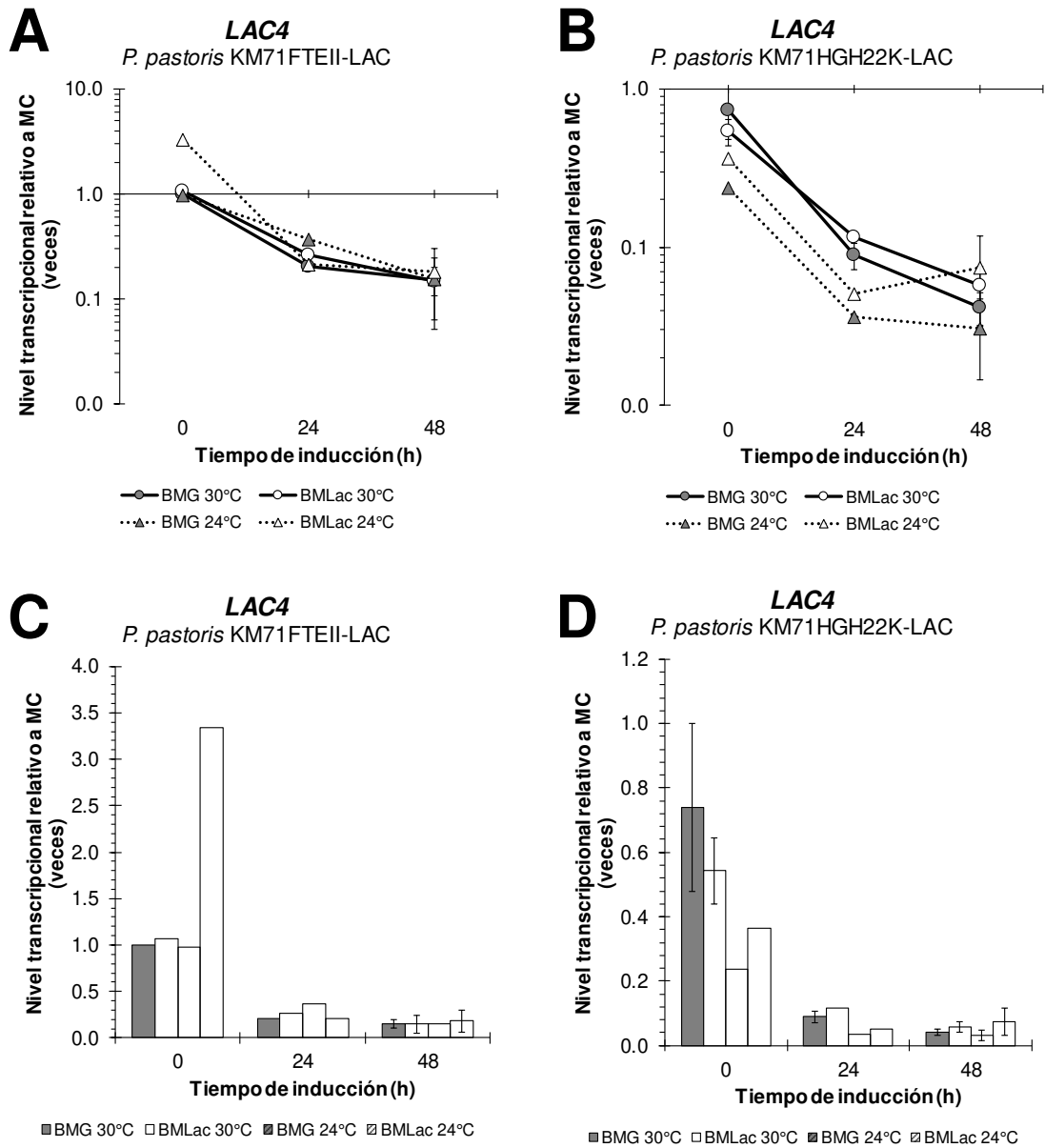
**Figura 43.** Niveles transcripcionales del gen normalizador *YPT1* a las 0, 24 y 48 h de inducción. A) y C) Cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII (control) a distintas condiciones de cultivo. B) y D) Cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K (control) a distintas condiciones de cultivo. MC: muestra calibradora (BMG 30 °C 0 h de KM71FTEII-LAC para KM71FTEII-LAC y KM71FTEII, y BMG 30 °C 0 h de KM71HGH22K-LAC para KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K). Las barras de error muestran el error estándar de las condiciones evaluadas con duplicados o triplicados biológicos. Se omiten las siguientes condiciones: KM71FTEII en BMG inicial a 30 °C y a 24 °C a las 48 h, KM71HGH22K en BMG inicial a 30 °C a las 24 h y en BMG inicial a 24 °C a las 48 h.

Los niveles transcripcionales del gen *GAP* (**Figura 44**) presentaron mayor cambio como consecuencia de las condiciones de inducción empleando metanol como fuente de carbono. En todas las cepas evaluadas y bajo todas las condiciones evaluadas se observó un mayor nivel transcripcional del gen *GAP* a las 0 h, (antes de iniciar el cultivo en metanol) respecto a las 24 y 48 horas de cultivo en metanol. Los niveles más altos de expresión del gen *GAP* a las 0 h los presentaron las dos cepas control a 30 °C. Estos resultados contrastan con los resultados obtenidos en los análisis previos de los transcriptomas (**Tabla 73**), en los cuales, los niveles de *GAP* son significativamente mayores para la cepa KM71LAC412 cultivada en BMGlc comparados con los de su cepa control KM71pPIC9 en BMGlc. Por otro lado, la disminución de la expresión del gen *GAP* coincide con los resultados obtenidos de los transcriptomas de KM71LAC412 en BMLac y BMLacMet, en los cuales los niveles del gen *GAP* fueron significativamente menores en BMLacMet.

Los niveles transcripcionales del gen *LAC4* (**Figura 45**) disminuyeron con el tiempo de inducción con una respuesta similar a la presentada por el gen *GAP*. Dado que los genes *GAP* y *LAC4* se encuentran regulados por el mismo promotor, se esperaría una respuesta transcripcional semejante en ambos. En KM71HGH22K-LAC a las 0 h, se presentaron diferencias en el comportamiento de expresión de *GAP* y *LAC4*. En esta cepa, el número de transcritos de *GAP* en todas las condiciones al tiempo 0 h fue aproximadamente dos veces mayor que el de la muestra calibradora, mientras que para *LAC4* los niveles fueron diferentes entre las condiciones y menores a 0.8 veces los niveles de transcripción de la muestra calibradora. En la cepa KM71FTEII-LAC, los niveles de *GAP* a las 0 h fueron diferentes entre las condiciones de cultivo, mientras que los niveles de *LAC4* a las 0 h fueron constantes en tres de las condiciones evaluadas presentando niveles de expresión similares a los de la muestra calibradora. Para esta cepa, los niveles de *LAC4* y de *GAP* del cultivo a 24 °C en BMLac inicial fueron el triple y el doble de transcritos respecto a la muestra calibradora.

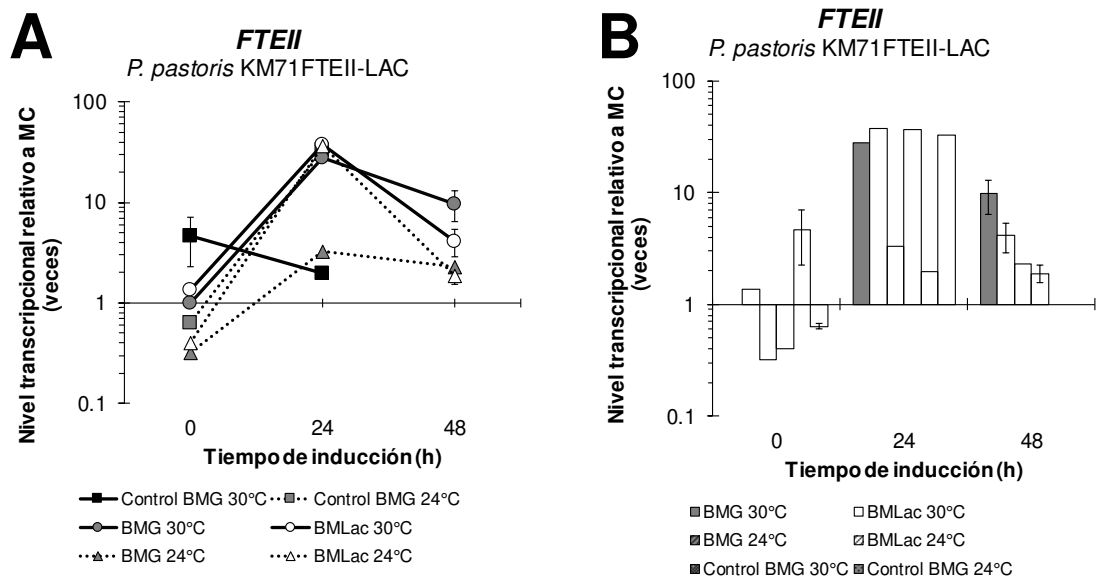


**Figura 44.** Niveles transcripcionales del gen *GAP* a las 0, 24 y 48 h de inducción. A) y C) Cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII (control) a distintas condiciones de cultivo. B) y D) Cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K (control) a distintas condiciones de cultivo. MC: muestra calibradora (BMG 30 °C 0 h de KM71FTEII-LAC para KM71FTEII-LAC y KM71FTEII, y BMG 30 °C 0 h de KM71HGH22K-LAC para KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K). Las barras de error muestran el error estándar de las condiciones evaluadas con duplicados o triplicados biológicos. Se omiten las siguientes condiciones: KM71FTEII en BMG inicial a 30 °C y a 24 °C a las 48 h, KM71HGH22K en BMG inicial a 30 °C a las 24 h y en BMG inicial a 24 °C a las 48 h.

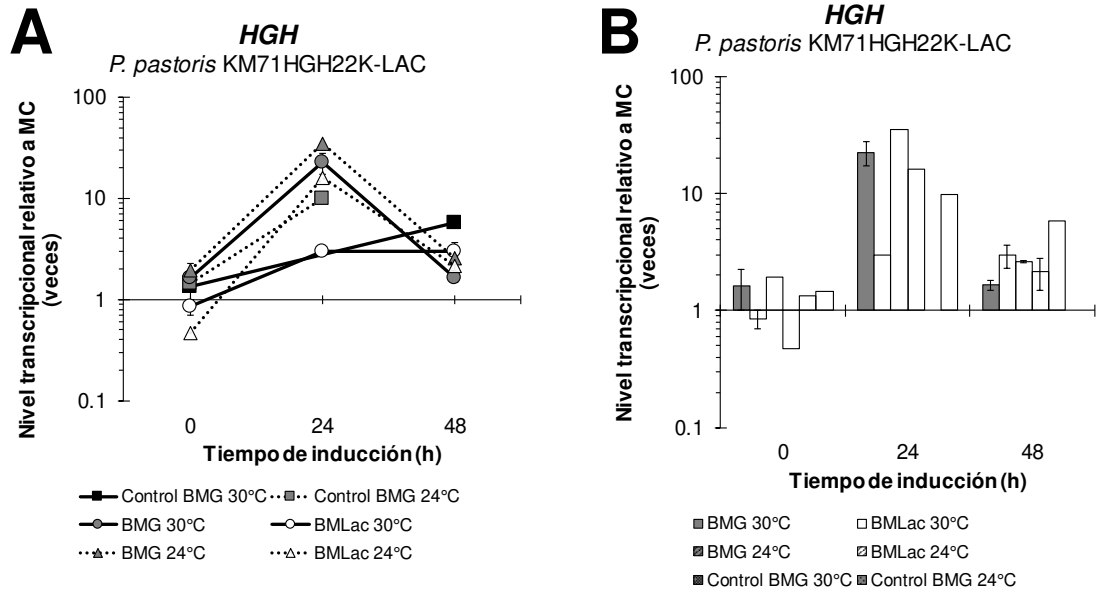


**Figura 45.** Niveles transcripcionales del gen *LAC4* a las 0, 24 y 48 h de inducción. A) y C) Cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII (control) a distintas condiciones de cultivo. B) y D) Cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K (control) a distintas condiciones de cultivo. MC: muestra calibradora (BMG 30 °C 0 h de KM71FTEII-LAC para KM71FTEII-LAC y KM71FTEII, y BMG 30 °C 0 h de KM71HGH22K-LAC para KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K). El eje de las ordenadas se presenta en escala logarítmica. Las barras de error muestran el error estándar de las condiciones evaluadas con duplicados o triplicados biológicos. Se omiten las siguientes condiciones: KM71FTEII en BMG inicial a 30 °C y a 24 °C a las 48 h, KM71HGH22K en BMG inicial a 30 °C a las 24 h y en BMG inicial a 24 °C a las 48 h.

Los niveles transcripcionales de los genes heterólogos regulados por el promotor *AOX1* (**Figura 46** para *FTEII* y **Figura 47** para *HGH*) presentaron un máximo de expresión a las 24 h en todas las condiciones de cultivo. Los niveles de expresión de *FTEII* a las 24 h de cultivo en metanol presentaron valores mayores a 10 veces la muestra calibradora (0 h) para la cepa de KM71FTEII-LAC y su cepa control en las condiciones evaluadas. La excepción a lo anterior fueron los cultivos de KM71FTEII-LAC en BMG para generar biomasa y crecida en metanol a 24°C, y de KM71FTEII a 30 °C, presentando niveles 12 veces más bajos que el resto de las condiciones a las 24 h. Sin embargo, al contrario que en la cepa KM71FTEII-LAC, los niveles de *HGH* en KM71HGH22K-LAC más altos a las 24 h se obtuvieron a 24 °C en BMG inicial. Para ambas cepas los niveles de expresión disminuyeron a las 48 h a todas las condiciones evaluadas.

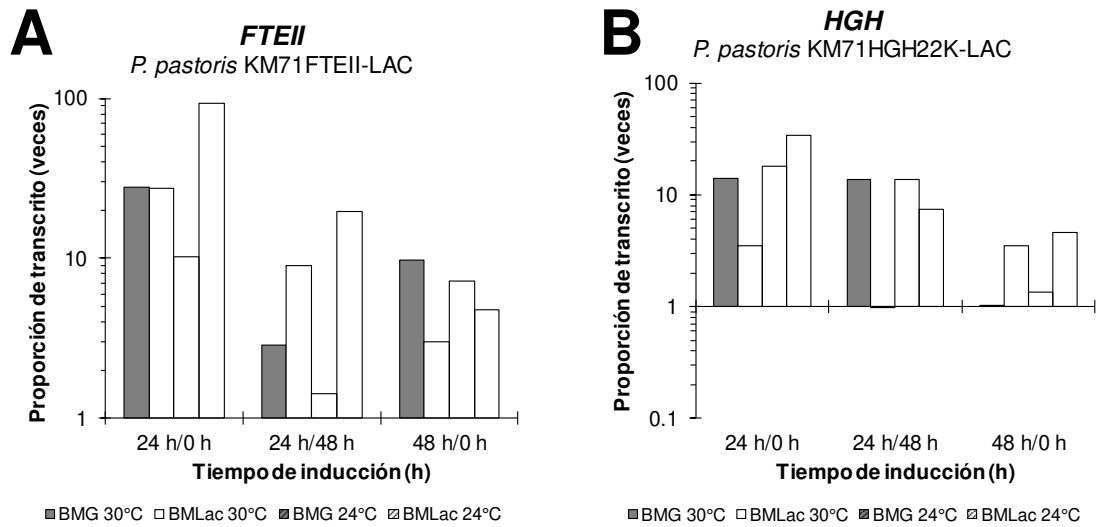


**Figura 46.** Niveles transcripcionales del gen *FTEII* a las 0, 24 y 48 h de inducción. A) y B) Cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII (control) a distintas condiciones de cultivo. MC: muestra calibradora (BMG 30 °C 0 h de KM71FTEII-LAC para KM71FTEII-LAC y KM71FTEII). El eje de las ordenadas se presenta en escala logarítmica. Las barras de error muestran el error estándar de las condiciones evaluadas con duplicados o triplicados biológicos. Se omiten las siguientes condiciones: KM71FTEII en BMG inicial a 30 °C y a 24 °C a las 48 h.



**Figura 47.** Niveles transcripcionales del gen *HGH* a las 0, 24 y 48 h de inducción. A) y B) Cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K (control) a distintas condiciones de cultivo. MC: muestra calibradora (BMG 30 °C 0 h de KM71HGH22K-LAC para KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K). El eje de las ordenadas se presenta en escala logarítmica. Las barras de error muestran el error estándar de las condiciones evaluadas con duplicados o triplicados biológicos. Se omiten las siguientes condiciones: KM71HGH22K en BMG inicial a 30 °C a las 24 h y en BMG inicial a 24 °C a las 48 h.

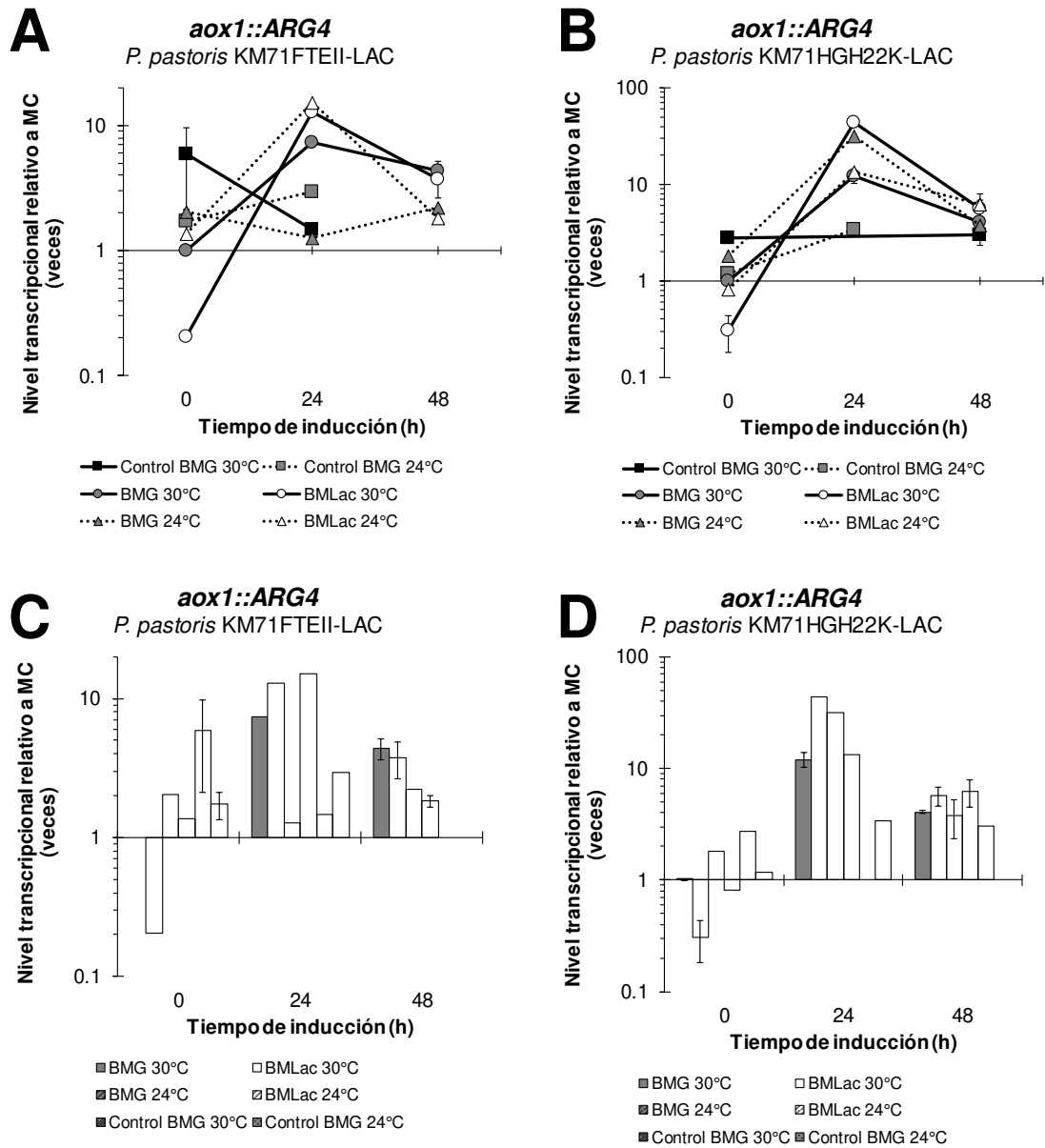
La proporción de aumento de los niveles transcripcionales de los genes *FTEII* y *HGH* entre distintos tiempos de inducción (**Figura 48**) indicó que para la cepa KM71FTEII-LAC, la condición con menor aumento de transcritos de las 0 h a las 24 h fue la de 24 °C en BMG inicial, siendo el aumento al menos 3 veces menor que el resto de las condiciones de cultivo. Para la cepa KM71HGH22K-LAC, la condición con menor aumento de transcritos de las 0 h a las 24 h fue a 30 °C en BMLac, siendo el aumento al menos 3 veces menor que el resto de las condiciones de cultivo. Los incrementos más altos de niveles de expresión de las 0 a las 24 h de haber iniciado el cultivo en metanol se obtuvieron en ambas cepas generando la biomasa en BMLac y cultivando a 24°C.



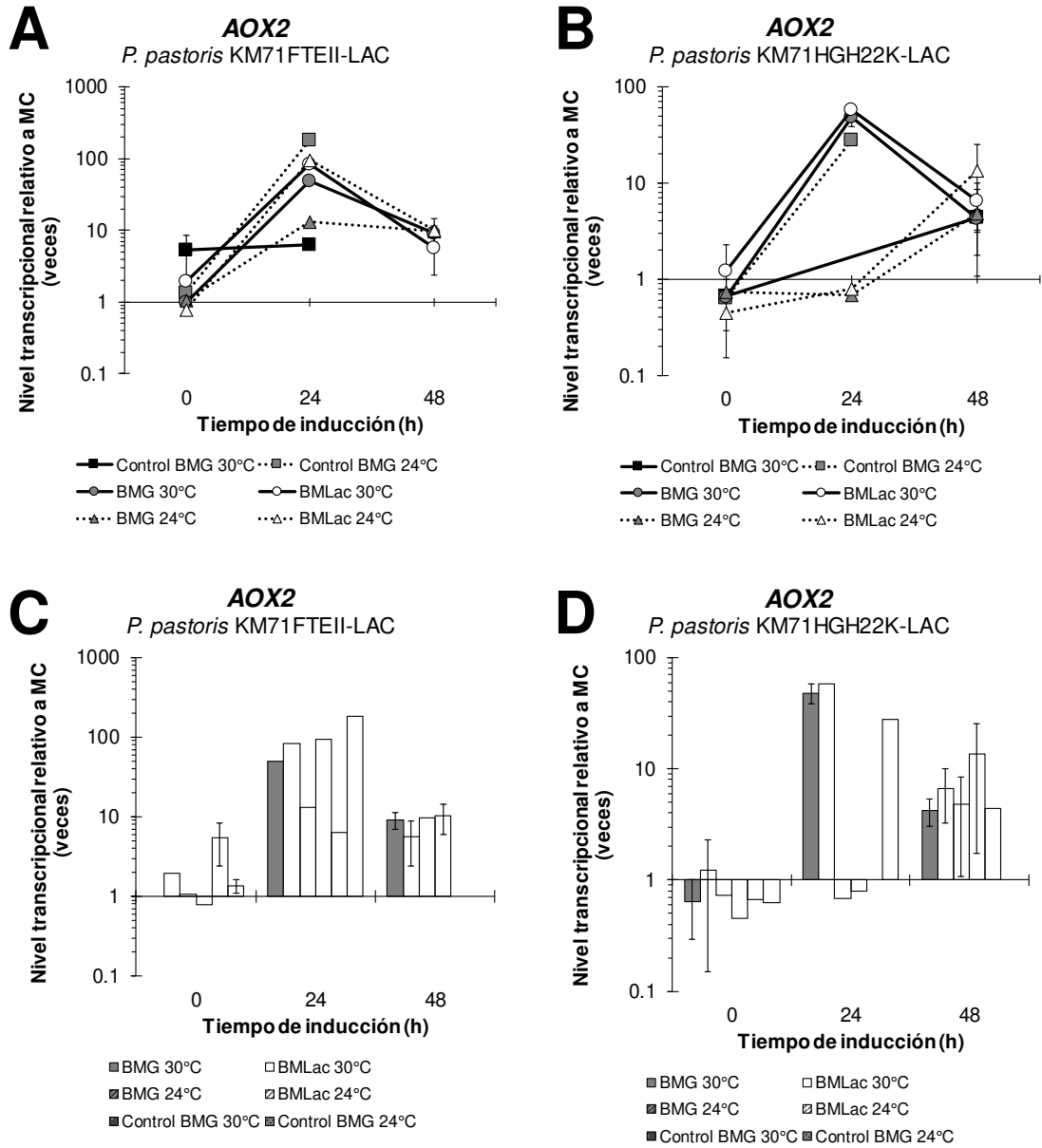
**Figura 48.** Proporción entre los niveles transcripcionales a distintos tiempos de inducción de los genes *FTEII* y *HGH*. A) Cepa KM71FTEII-LAC a distintas condiciones de cultivo. B) Cepa KM71HGH22K-LAC a distintas condiciones de cultivo. La proporción se calculó dividiendo los niveles transcripcionales (relativos a la muestra calibradora) de los tiempos de inducción indicados para cada condición de cultivo. El eje de las ordenadas se presenta en escala logarítmica.

El análisis de los genes codificantes para alcohol oxidasa mostró que en la cepa KM71FTEII-LAC los perfiles de expresión de fueron similares para los transcritos de *aox1::ARG4*, *AOX2*, *DAS* e incluso *FTEII* a lo largo del cultivo (0 a 48 h). En esta misma cepa, a las 24 h, se detectaron niveles 10 veces menores de transcritos de los genes inducidos por metanol *aox1::ARG4* (**Figura 49**) y *AOX2* (**Figura 50**) cuando la biomasa se generó en BMG a 24 °C, comparados con las otras condiciones de cultivo evaluadas. La cepa control productora de FTEII presentó niveles variables de expresión de estos genes a las condiciones señaladas para la cepa KM71FTEII-LAC a las 24 h del cultivo en metanol. Para la cepa KM71HGH22K-LAC cultivada a 24 °C, los niveles de *AOX2* a las 24 h fueron aproximadamente 60 veces menores a los de los cultivos a 30 °C.



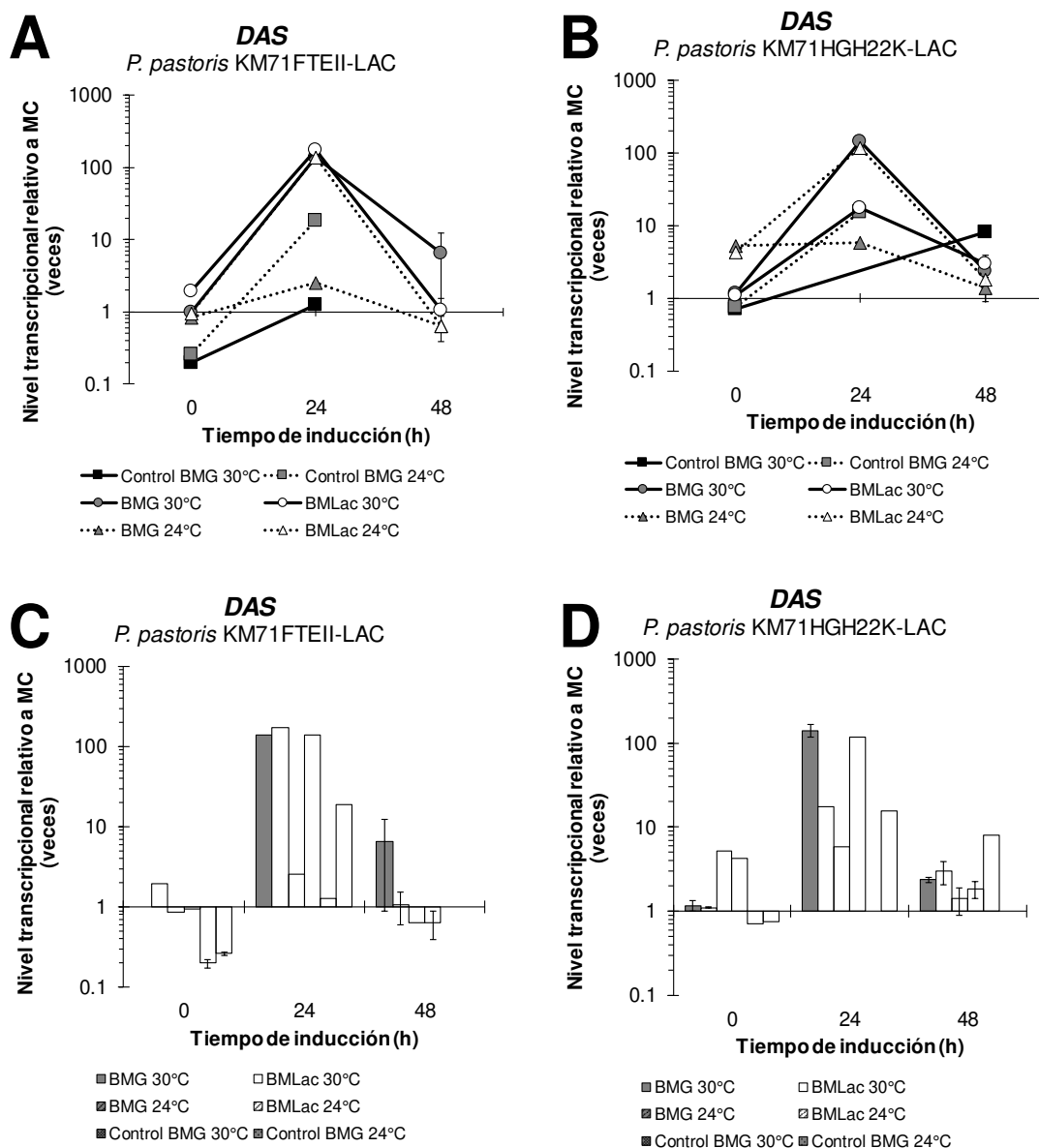


**Figura 49.** Niveles transcripcionales del gen *aox1::ARG4* a las 0, 24 y 48 h de inducción. A) y C) Cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII (control) a distintas condiciones de cultivo. B) y D) Cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K (control) a distintas condiciones de cultivo. MC: muestra calibradora (BMG 30 °C 0 h de KM71FTEII-LAC para KM71FTEII-LAC y KM71FTEII, y BMG 30 °C 0 h de KM71HGH22K-LAC para KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K). El eje de las ordenadas se presenta en escala logarítmica. Las barras de error muestran el error estándar de las condiciones evaluadas con duplicados o triplicados biológicos. Se omiten las siguientes condiciones: KM71FTEII en BMG inicial a 30 °C y a 24 °C a las 48 h, KM71HGH22K en BMG inicial a 30 °C a las 24 h y en BMG inicial a 24 °C a las 48 h.



**Figura 50.** Niveles transcripcionales del gen *AOX2* a las 0, 24 y 48 h de inducción. A) y C) Cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII (control) a distintas condiciones de cultivo. B) y D) Cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K (control) a distintas condiciones de cultivo. MC: muestra calibradora (BMG 30 °C 0 h de KM71FTEII-LAC para KM71FTEII-LAC y KM71FTEII, y BMG 30 °C 0 h de KM71HGH22K-LAC para KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K). El eje de las ordenadas se presenta en escala logarítmica. Las barras de error muestran el error estándar de las condiciones evaluadas con duplicados o triplicados biológicos. Se omiten las siguientes condiciones: KM71FTEII en BMG inicial a 30 °C y a 24 °C a las 48 h, KM71HGH22K en BMG inicial a 30 °C a las 24 h y en BMG inicial a 24 °C a las 48 h.

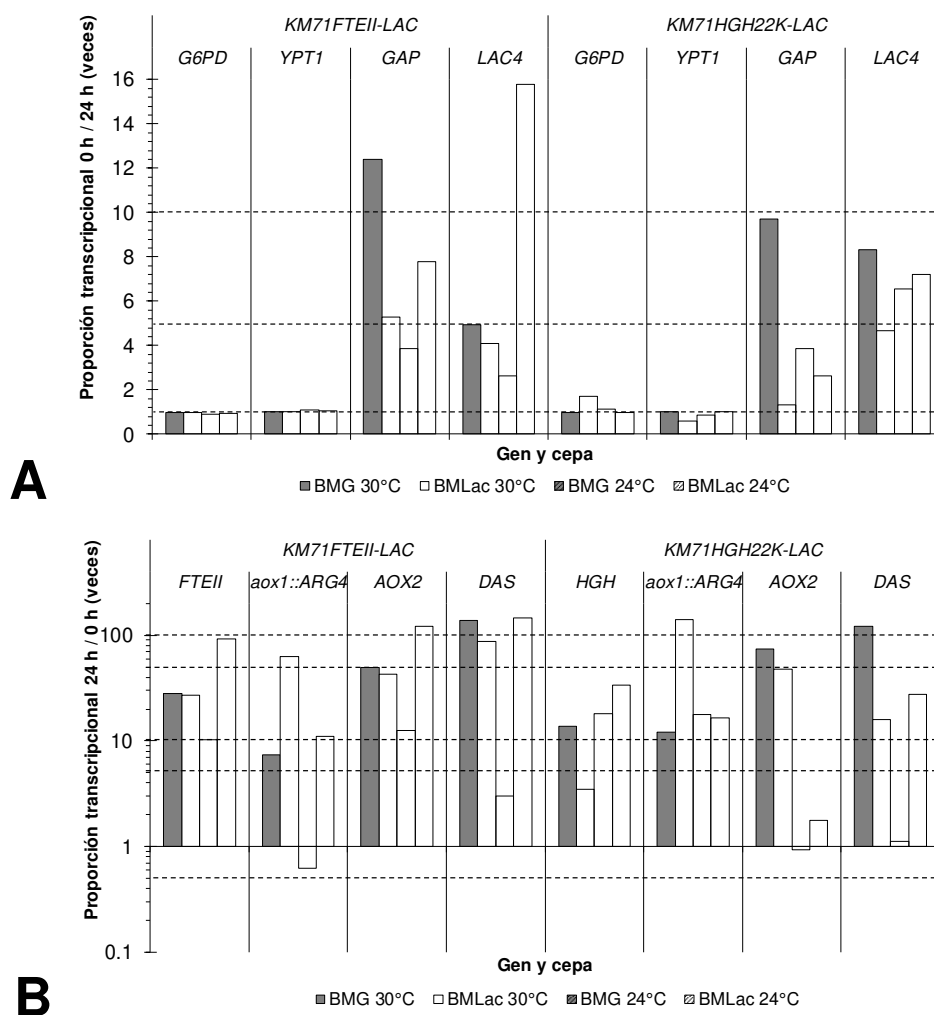
Los niveles transcripcionales del gen *DAS* (**Figura 51**), al igual que los de *aox1::ARG4*, *FTEII*, *HGH* y *AOX2*, mostraron un máximo de expresión a las 24 h. En ambas cepas *LAC* evaluadas, la condición que mostró el menor aumento transcripcional de las 0 a las 24 h fue el cultivo a 30 °C en BMG inicial.



**Figura 51.** Niveles transcripcionales del gen *DAS* a las 0, 24 y 48 h de inducción. A) y C) Cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII (control) a distintas condiciones de cultivo. B) y D) Cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K (control) a distintas condiciones de cultivo. MC: muestra calibradora (BMG 30 °C 0 h de KM71FTEII-LAC para KM71FTEII-LAC y KM71FTEII, y BMG 30 °C 0 h de KM71HGH22K-LAC para KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K). El eje de las ordenadas se presenta en escala logarítmica. Las barras de error muestran el error estándar de las condiciones evaluadas con duplicados o triplicados biológicos. Se omiten las siguientes condiciones: KM71FTEII en BMG inicial a 30 °C y a 24 °C a las 48 h, KM71HGH22K en BMG inicial a 30 °C a las 24 h y en BMG inicial a 24 °C a las 48 h.

### 7.2.3.4. Proporción de niveles transcripcionales de genes evaluados a diferentes tiempos de inducción

El aumento de los niveles transcripcionales a diferentes tiempos de inducción, calculado por la división de los niveles transcripcionales a las 0 h de los genes *G6PD*, *YPT1*, *GAP* y *LAC4* entre sus niveles transcripcionales a las 24 h (**Figura 52**, panel A), y de los niveles transcripcionales a las 24 h de los genes *FTEII*, *HGH*, *aox1::ARG4*, *AOX2* y *DAS* entre sus niveles transcripcionales a las 0 h (**Figura 52**, panel B), mostró que algunas condiciones de cultivo presentaron diferentes proporciones de aumento o disminución del gen al comparar las dos cepas.



**Figura 52.** Proporción transcripcional de los genes analizados entre dos tiempos de su inducción. Se incluyen líneas de referencia para facilitar la lectura en el eje. A) Proporción transcripcional (veces) de las 0 h respecto a las 24 h de los genes *G6PD*, *YPT1*, *GAP* y *LAC4* de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC. B) Proporción transcripcional (veces) de las 24 h respecto a las 0 h de los genes *FTEII* o *HGH*, *aox1::ARG4*, *AOX2* y *DAS* de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC.

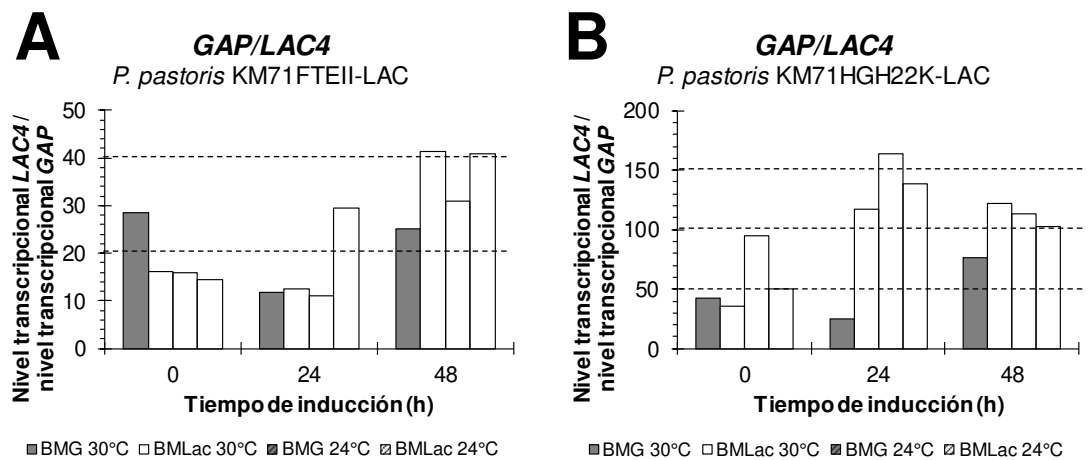
Como se mencionó previamente, el nivel transcripcional de los genes normalizadores *G6PD* y *YPT1* no presentó variación entre los dos tiempos de inducción. La mayor disminución de la expresión del gen *GAP* (de las 0 a las 24 h) en las dos cepas lo presentó la condición de cultivo a 30 °C en BMG inicial. Cabe destacar que, a pesar de que tanto el gen *GAP* como *LAC4* se encuentran regulados por el promotor de *GAP*, la proporción de disminución del nivel de expresión de las 0 a las 24 h no fue igual para ambos genes en algunas condiciones de cultivo. Como ejemplo, en la cepa KM71FTEII-LAC, el gen *LAC4* en la condición de cultivo a 24 °C en BMLac inicial presentó una disminución de 16 veces contra las 8 veces que presentó el gen *GAP* en esa misma condición. De manera similar, en la condición de cultivo a 30 °C en BMG inicial, la disminución de proporción del gen *GAP* fue de 12 veces y la de *LAC4*, 5 veces. En la cepa KM71HGH22K-LAC, la disminución del gen *LAC4* también fue mayor que la del gen *GAP*.

En general, en las cepas F-L y H-L bajo condiciones de inducción, la respuesta de *AOX2* es diferente a la de *aox1::ARG4*. En ambas cepas, el mayor aumento proporcional de las 0 a las 24 h del gen heterólogo regulado por el promotor de *AOX1* (*FTEII* o *HGH*) lo presentó la condición de cultivo a 24 °C en BMLac inicial; y el mayor aumento del gen *aox1::ARG4* lo presentó la condición de cultivo a 30 °C en BMLac inicial. En la cepa KM71HGH22K-LAC, las condiciones de cultivo a 24 °C en BMG y en BMLac inicial no presentaron aumento del nivel transcripcional del gen *AOX2*. En ambas cepas, la proporción de aumento del nivel de expresión del gen *DAS* en la condición a 24 °C en BMG inicial fue desproporcionadamente baja en comparación con el resto de las condiciones.

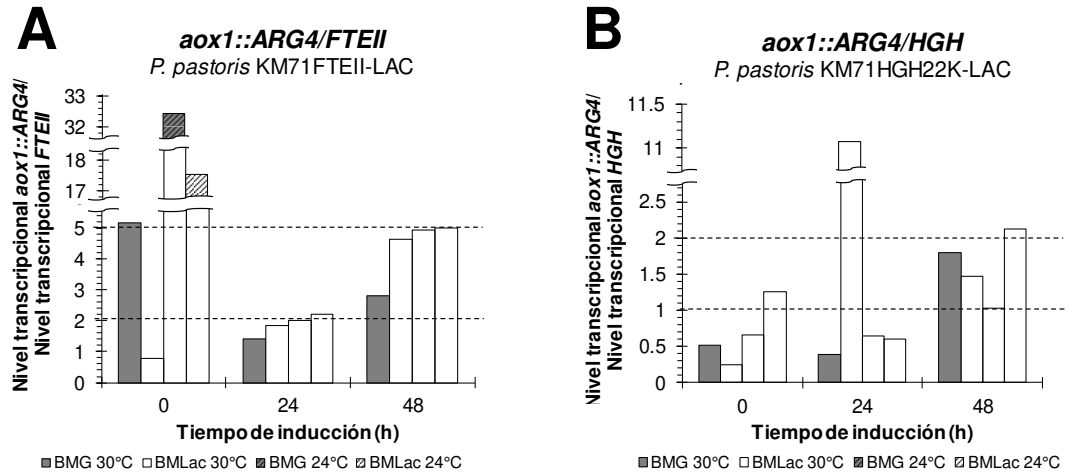
#### 7.2.3.5. Cuantificación absoluta

La cuantificación absoluta (que emplea la **Ecuación 7** en su cálculo) permitió comparar los niveles de expresión entre distintos genes y no solamente entre las condiciones de cultivo. Se calculó la proporción transcripcional de genes regulados por el mismo promotor: *GAP* y *LAC4* (regulados por el promotor de *GAP*) (**Figura 53**), y *aox1::ARG4* y *FTEII* o *hGH* (regulados por el promotor de *AOX1*) (**Figura 54**). La proporción transcripcional de ambos genes resultó ser distinta entre las dos cepas. Al

dividir la cantidad de RNA absoluta de *GAP* sobre la de *LAC4* de la misma muestra se observó que la proporción *GAP/LAC4* fue consistentemente menor en la cepa KM71FTEII-LAC en comparación con la cepa KM71HGH22K-LAC. Asumiendo una cantidad de transcrito de *GAP* similar entre las dos cepas, esta menor proporción *GAP/LAC4* en KM71FTEII-LAC indicaría que existe una mayor cantidad de transcrito de *LAC4* en KM71FTEII-LAC en comparación con KM71HGH22K-LAC, lo que a su vez podría derivar de la posible presencia de un mayor número de copias del gen heterólogo *LAC4* en KM71FTEII-LAC en comparación con KM71HGH22K-LAC. Otra tendencia observada fue el aumento de esta proporción en etapas tardías de inducción, siendo la proporción a las 48 h cerca del doble de la presentada a las 0 h para la mayoría de las condiciones de cultivo. Esto quiere decir que la presencia o ausencia de metanol influye de forma distinta en la expresión de los genes *GAP* y *LAC4*, ya que si su expresión estuviera regulada de la misma forma, la proporción *GAP/LAC4* no presentaría variaciones entre los distintos tiempos y condiciones de cultivo.

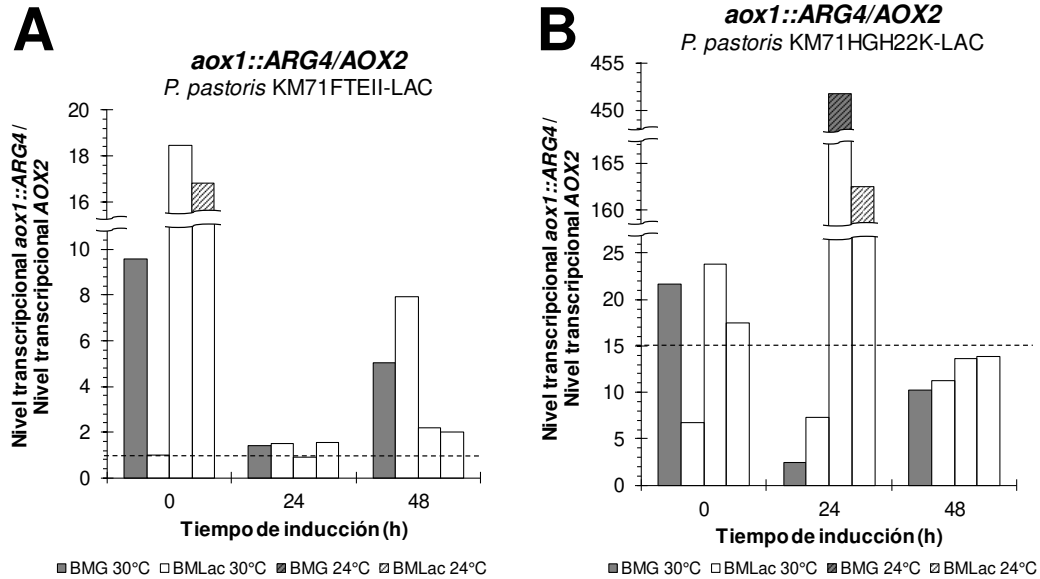


**Figura 53.** Proporción de niveles transcripcionales de los genes regulados por el promotor *GAP*: *GAP* y *LAC4*, empleando una cuantificación absoluta. Se incluyen líneas de referencia para la comparación con el eje. A) Proporción *GAP/LAC4* para la cepa KM71FTEII-LAC. B) Proporción *GAP/LAC4* para la cepa KM71HGH22K-LAC.



**Figura 54.** Proporción de niveles transcripcionales de los genes regulados por el promotor *AOX1*: *aox1::ARG4*, *FTEII* y *HGH*, empleando una cuantificación absoluta. A) Proporción *aox1::ARG4/FTEII* para la cepa KM71FTEII-LAC. B) Proporción *aox1::ARG4/HGH* para la cepa KM71HGH22K-LAC.

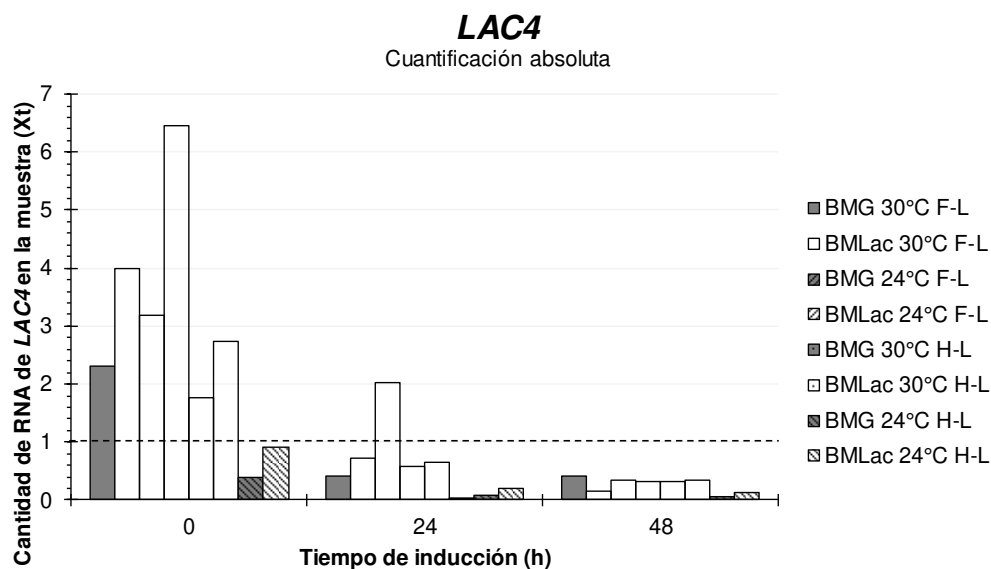
También se compararon los niveles de transcritos de los genes de alcohol oxidasa: *aox1::ARG4* (gen interrumpido) y *AOX2* (**Figura 55**). Los niveles de *aox1::ARG4* generalmente fueron mayores a los de *AOX2* en las muestras evaluadas, excepto a las 24 h en la cepa KM71FTEII-LAC para la condición de cultivo de BMG a 24 °C. Cabe destacar que los niveles de *AOX2* fueron cercanos a los de *aox1::ARG4* a las 24 h en la cepa KM71FTEII-LAC. En la cepa KM71HGH22K-LAC, los niveles de *aox1::ARG4* resultaron más altos que los de *AOX2*, llegándolos a superar más de 450 veces en la condición de cultivo a 24 °C en BMG inicial a las 24 h, lo que es un comportamiento totalmente distinto al de la cepa KM71FTEII-LAC en el mismo tiempo y condición.



**Figura 55.** Proporción de niveles transcripcionales de los genes *AOX*: *aox1::ARG4* y *AOX2*, empleando una cuantificación absoluta. A) Proporción *aox1::ARG4/AOX2* para la cepa KM71FTEII-LAC. B) Proporción *aox1::ARG4/AOX2* para la cepa KM71HGH22K-LAC.

Los datos del nivel transcripcional del gen *LAC4* en cuantificación absoluta (**Figura 56**) indicaron que, a los tres tiempos de inducción analizados, la preparación con la menor expresión de *LAC4* fue la de la cepa KM71HGH22K-LAC cultivada en BMG inicial a 24 °C; y que a las 0 h de inducción la preparación con la mayor expresión fue la de la cepa KM71FTEII-LAC cultivada en BMLac inicial a 24 °C, con al menos 50 % mayor cantidad de transcritos de *LAC4* en comparación con el resto de las condiciones. También se observó que a las 0 h, hubo una mayor expresión de *LAC4* en las condiciones de cultivo con BMLac inicial en comparación con la condición equivalente en BMG. De igual forma, se observó que el efecto de la temperatura a las 0 h, antes de la inducción con metanol, fue distinto para las dos cepas analizadas, ya que hubo mayor expresión a 30 °C en KM71FTEII-LAC, y mayor a 24 °C en KM71HGH22K-LAC en comparación con la temperatura de cultivo alterna para la misma cepa y condición de cultivo.

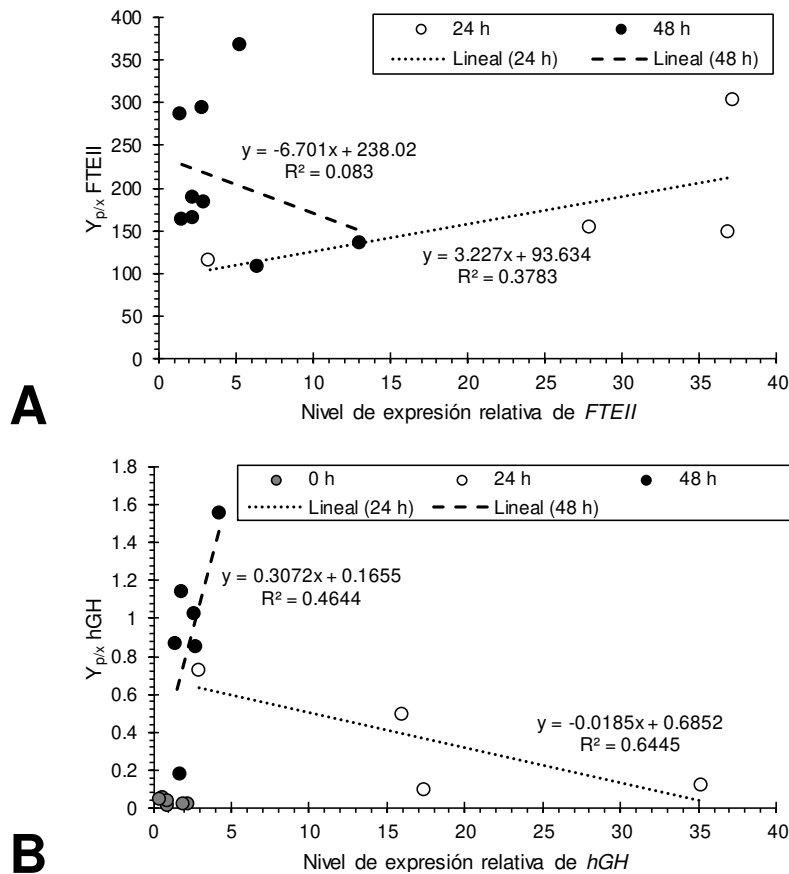




**Figura 56.** Promedio de los niveles transcripcionales de *LAC4* de la cuantificación relativa-absoluta para las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en todos los tiempos y condiciones de cultivo probadas.

#### 7.2.4. Correlación entre el rendimiento de producto/biomasa y el nivel de expresión relativa de FTEII y hGH

La comparación del  $Y_{p/x}$  y los niveles de expresión relativa de los genes heterólogos regulados por el promotor *AOX1* (**Figura 57**), a 24 y 48 h de inducción, indicó que no existió una correlación entre estos que obtuviera un valor de  $R^2$  superior a 0.7. Las mayores correlaciones se presentaron en los análisis de la cepa KM71HGH22K-LAC ( $R^2$  de 0.6445 y 0.4644 a las 24 y 48 h respectivamente). En ambas cepas evaluadas, la correlación fue mayor a las 24 h que a las 48 h, sin embargo, en KM71FTEII-LAC se obtuvo una tendencia hacia una correlación positiva a las 24 h, y en KM71HGH22K-LAC se obtuvo una tendencia hacia una correlación negativa a ese mismo tiempo. A pesar de lo anterior, no es posible afirmar que exista una correlación importante entre el  $Y_{p/x}$  y los niveles de expresión relativa.



**Figura 57.** Correlación entre  $Y_{p/x}$  y niveles de expresión relativa de genes heterólogos regulados por el promotor *AOXI*. Las líneas punteadas representan la línea de tendencia de los datos obtenidos a las 24 o 48 h de inducción. Se incluye la ecuación de esta recta y su coeficiente de determinación ( $R^2$ ) A) Correlación de  $Y_{p/x}$  de FTEII y nivel de expresión de FTEII. B) Correlación de  $Y_{p/x}$  de hGH y nivel de expresión de hGH.

### 7.3. OBJETIVO 3. Construcción de una cepa de *P. pastoris* productora de una $\beta$ -galactosidasa extracelular

#### 7.3.1. Obtención de la secuencia sintética de la $\beta$ -galactosidasa extracelular a producir en *P. pastoris*

##### 7.3.1.1. Elección de la secuencia de la $\beta$ -galactosidasa extracelular a producir en *P. pastoris*

La búsqueda de información conforme a lo descrito en el apartado **6.4.3.1** y la recopilación de información sobre las  $\beta$ -galactosidasas expresadas de manera heteróloga en *P. pastoris* reportadas en la literatura (**Tabla 2**) permitieron seleccionar la proteína a expresar empleando los criterios descritos en la metodología: que la enzima fuera extracelular y monomérica, que perteneciera a un organismo taxonómicamente cercano a *P. pastoris* (preferiblemente un hongo) y que fuera similar a  $\beta$ -galactosidasas con

expresión reportada en *P. pastoris* con anterioridad. Se eligió la  $\beta$ -galactosidasa de *Paecilomyces aeruginus* por cumplir con los criterios ya mencionados, presentar actividad a las condiciones de cultivo de *P. pastoris* (30 °C, pH 6) (**Tabla 91**) y por tener el más alto rendimiento reportado para la producción de  $\beta$ -galactosidasa en un cultivo de alta densidad de *P. pastoris* (22 mg/mL con actividad de 9500 U/mL) y una actividad específica reportada relativamente alta (820 U/mg purificada) (Katrolia et al. 2011). Esta proteína posee 1011 aminoácidos, entre los que se incluyen los del péptido señal (primeros 18 aminoácidos); la proteína madura presenta un peso molecular de 108.6 Da, un pI teórico de 6.6 y cinco potenciales sitio de N-glicosilación. La secuencia nucleotídica que codifica para esta enzima se encuentra en la base de datos de GenBank, con el acceso GU721031.

**Tabla 91.** Parámetros de la  $\beta$ -galactosidasa elegida.

Parámetros	Valor
Origen de la secuencia de $\beta$ -galactosidasa fúngica	<i>P. aeruginus</i>
Tamaño de la proteína sin péptido señal	993 aa, aproximadamente 109 kDa
Tamaño de la secuencia nucleotídica a sintetizar	3002 pb
Temperatura óptima reportada	60 °C (35 % de actividad relativa a 30 °C)
pH óptimo reportado	4.5 (60 % de actividad relativa a pH 6)
¿Expresada previamente en <i>P. pastoris</i> ?	Sí (Katrolia et al. 2011)
Características de la secuencia utilizada en este estudio diferentes a las de la expresión ya reportada	Expresión regulada por promotor constitutivo y modificación con codones preferenciales para <i>P. pastoris</i> .

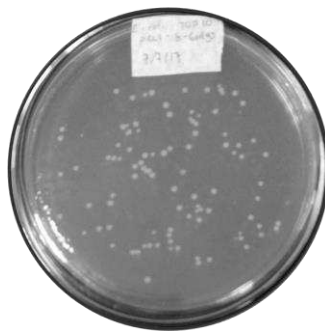
### 7.3.1.2. Diseño de la secuencia sintética de la $\beta$ -galactosidasa extracelular a producir en *P. pastoris*

La comparación de la secuencia nucleotídica codificante para la  $\beta$ -galactosidasa de *P. aeruginus* con codones preferenciales para *P. pastoris* (generada de la forma descrita en 6.4.3.2) y la secuencia del gen nativo permitió localizar 89 nucleótidos distintos entre éstas. La comparación de las secuencias aminoacídicas resultantes de la traducción de ambas no encontró diferencias entre sus aminoácidos, indicando que las sustituciones para generar la secuencia con codones preferenciales se realizaron sin alterar la secuencia aminoacídica resultante, por lo que la secuencia generada se aprobó para su síntesis.

### 7.3.1.3. Manejo y conservación en cepas de *E. coli* de la secuencia sintética codificante para $\beta$ -galactosidasa de *P. aeruginosa*

La secuencia enviada a sintetizar se obtuvo, con retraso por parte de la compañía de síntesis debido presumiblemente a problemas técnicos. Antes de la entrega la compañía reportó la síntesis de la secuencia en un vector distinto al solicitado, por lo cual requirió la confirmación para enviar la secuencia en el nuevo vector, sin mencionar una razón en específico para este cambio. El nuevo vector en el que estaría la secuencia fue el plásmido pCC1, que contiene como marcador un gen de resistencia a cloranfenicol. En el mensaje de confirmación, la compañía mencionó que junto con el plásmido incluiría un vial con células transformadas con el mismo (cepa denominada *E. coli* EPI300 pCC1-b-Galgs).

El plásmido pCC1-b-Galgs se recibió, junto con el vial de la cepa *E. coli* EPI300 pCC1-b-Galgs. La cepa se manejó conforme a las instrucciones de la compañía, y de un cultivo de ésta se obtuvo una muestra de DNA plasmídico a pequeña escala mediante lisis alcalina (concentración de 3123 ng/ $\mu$ L y relación A<sub>260/280</sub> de 2.117), la cual se empleó para la transformación de células de *E. coli* TOP10 calciocompetentes (6.4.3.3), obteniendo 95 colonias (**Figura 58**).



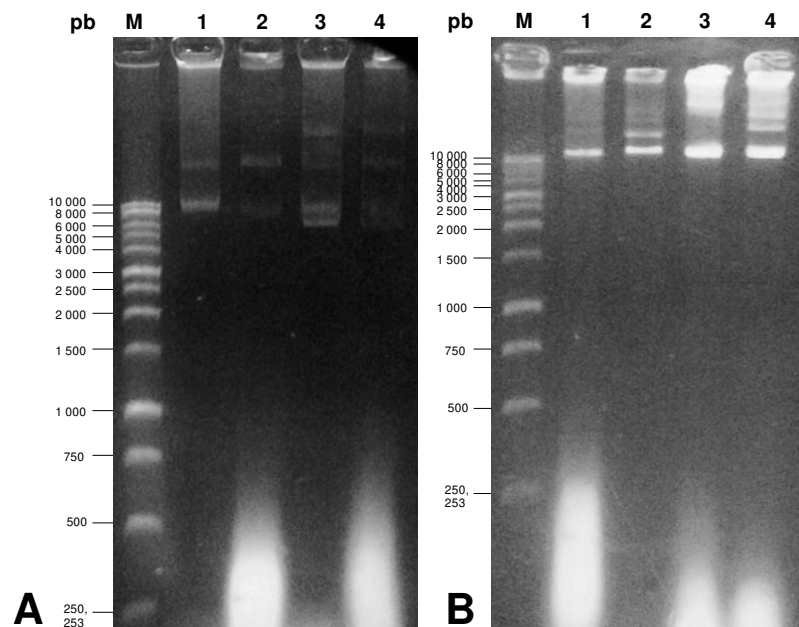
**Figura 58.** Resultado de la transformación de *E. coli* TOP10 con el plásmido pCC1-b-GalgsE obtenido a partir de la cepa de *E. coli* EPI300.

## 7.3.2. Primera construcción del plásmido pGAHbGalgs

### 7.3.2.1. Aislamiento de plásmidos pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII a mediana escala

El análisis por electroforesis de las extracciones a mediana escala de plásmidos a partir de cepas de *E. coli* TOP10 transformada con los plásmidos pCC1-b-GalgsE (pCC1-b-Galgs de la cepa de *E. coli* EPI300 enviada por GenScript) o pGAHFTEII, antes

(Figura 59, panel A, y Figura 60) y después del tratamiento con RNasa y la reextracción (Figura 59, panel B) confirmó la presencia e integridad de los plásmidos en las muestras.

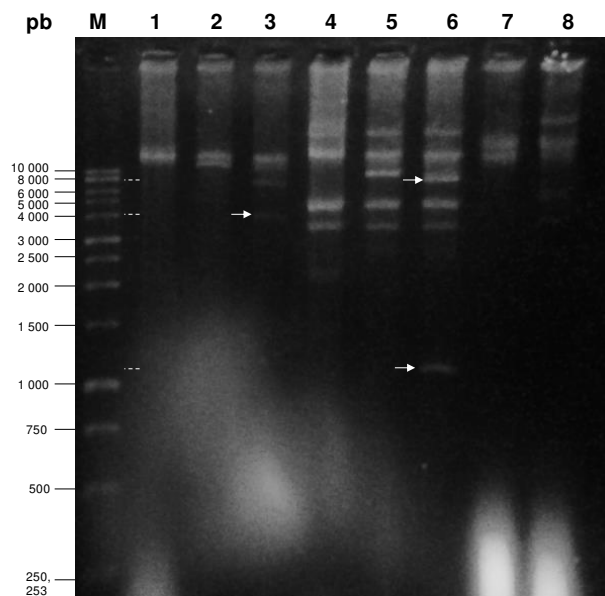


**Figura 59.** Obtención del plásmido pCC1-b-GalgsE por extracción a mediana escala y reextracción con solventes orgánicos. A) Muestras de DNA plasmídico extraídas a mediana escala (midipreps). Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.8  $\mu$ L). Carril 1: pCC1-b-GalgsE 1 (5  $\mu$ L). Carril 2: pCC1-b-GalgsE 2 (5  $\mu$ L). Carril 3: pGAHFTEII 1 (5  $\mu$ L) Carril 4: pGAHFTEII 2 (5  $\mu$ L) B) Midipreps después del tratamiento con RNasa y reextracción. Carril M: marcador 1 kb Ladder Promega (0.8  $\mu$ L). Carril 1: pCC1-b-GalgsE 1 (reextraído) (4  $\mu$ L). Carril 2: pCC1-b-GalgsE 2 (reextraído) (4  $\mu$ L). Carril 3: pGAHFTEII 1 (reextraído) (4  $\mu$ L). Carril 4: pGAHFTEII 2 (reextraído) (4  $\mu$ L).

### 7.3.2.2. Caracterización de los vectores pCC1-b-Galgs y pGAHFTEII por análisis con enzimas de restricción I

El análisis por electroforesis de las reacciones de restricción analíticas de los midipreps de pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII con las enzimas XhoI y NotI (6.4.4.2), mostró una digestión parcial de los plásmidos (Figura 60). El tamaño observado de los fragmentos liberados por pGAHFTEII en las reacciones de corte con XhoI y NotI, de ~7500-8000 pb (correspondiente al vector pGAH) y de ~1100 pb (correspondiente al fragmento del gen heterólogo *FTEII*) coincidió con el tamaño teórico esperado de 1087 pb para *FTEII*. El tamaño observado del fragmento más corto proveniente de pCC1-b-GalgsE después del corte con XhoI y NotI, el cual corresponde al inserto b-Galgs, fue de ~4000 pb, siendo mayor al tamaño teórico esperado de 2995 pb. Las posibles causas de la diferencia del tamaño del inserto b-Galgs entre el teórico y el observado pudieron ser el uso de pre-tinción de la muestra con GelRed en la electroforesis, la cual puede alterar el

tamaño observado de las bandas, o alteraciones en la secuencia del plásmido pCC1-b-GalgsE. Sin embargo, no se consideró que la secuencia presentara cambios y, debido a la liberación del fragmento con XhoI y NotI, se continuó con la siguiente etapa.

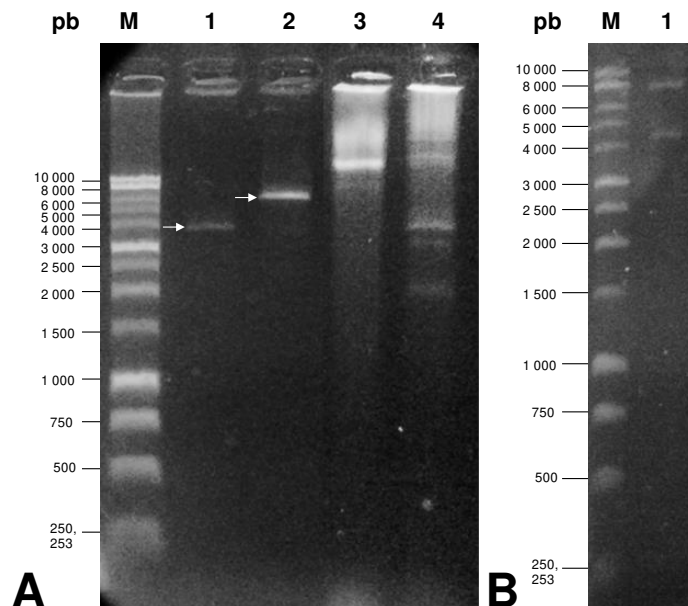


**Figura 60.** Caracterización por análisis de restricción con las enzimas XhoI y NotI de plásmidos pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.8  $\mu$ L). Carril 1: pCC1-b-GalgsE 1 (4  $\mu$ L). Carril 2: pCC1-b-GalgsE 1 + XhoI (10  $\mu$ L). Carril 3: pCC1-b-GalgsE 1 + XhoI + NotI (10  $\mu$ L). Carril 4: pGAHFTEII 1 (4  $\mu$ L). Carril 5: pGAHFTEII 1 + XhoI (10  $\mu$ L). Carril 6: pGAHFTEII 1 + XhoI + NotI (10  $\mu$ L). Carril 7: pCC1-b-GalgsE 3 (midiprep sin tratamiento) (5  $\mu$ L). Carril 8: pGAHFTEII 3 (midiprep sin tratamiento) (5  $\mu$ L). Se incluyen flechas y líneas punteadas como apoyo visual para determinar el tamaño de las bandas referenciadas en el texto.

### 7.3.2.3. Purificación de bandas de inserto y vector I

El análisis por electroforesis en gel de agarosa de las bandas purificadas de inserto b-Galgs y vector pGAH obtenidas por el método de filtración con algodón (6.4.4.3), (Figura 61, panel A) mostró que el tamaño del inserto no coincidió con el tamaño teórico de 2995 pb, sino que presentó un tamaño de ~4000 pb. Según el análisis por electroforesis, se contaba con la cantidad de inserto b-Galgs necesaria para llevar a cabo la reacción de ligación subsecuente.

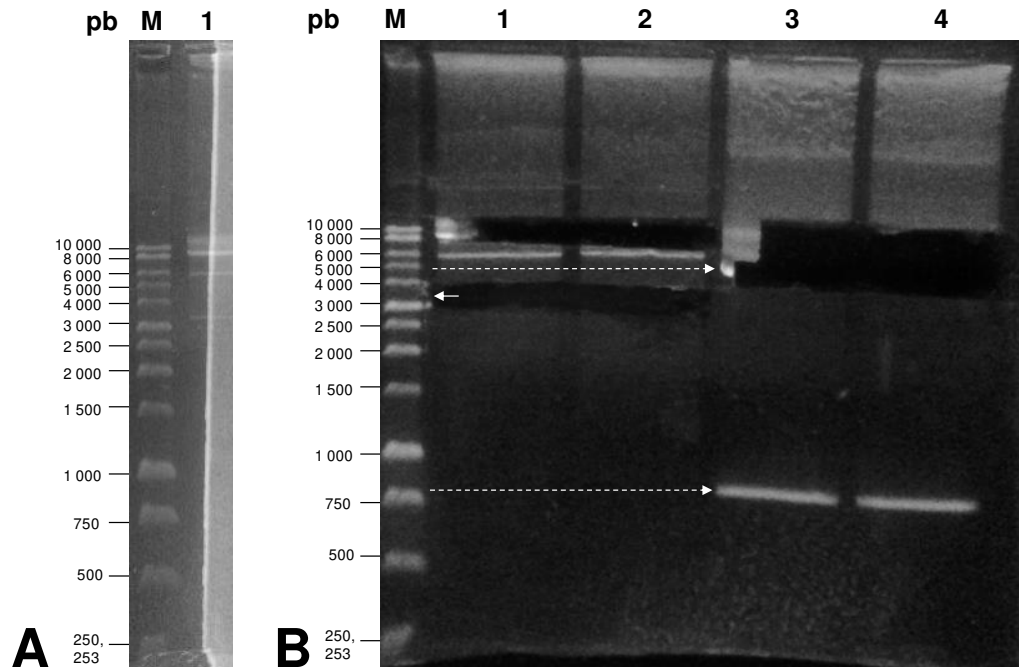
El análisis de la ligación I (6.4.4.4) por electroforesis comprobó que no se llevó a cabo, al mostrar dos bandas de tamaños aproximados a los del inserto y vector (Figura 61, panel B). Se decidió hacer nuevas digestiones preparativas para obtener más inserto b-Galgs purificado, y porque el método de purificación del algodón pudo haber añadido inhibidores a la reacción de ligación.



**Figura 61.** Electroforesis en gel de agarosa del primer intento de purificación y de ligación del inserto b-Galgs y el vector pGAH de la primera construcción. A) Verificación de calidad de inserto b-Galgs y vector pGAH purificados por el método de filtración con algodón. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (1  $\mu$ L). Carril 1: inserto b-Galgs purificado (3  $\mu$ L). Carril 2: vector pGAH purificado (3  $\mu$ L). Carril 3: pCC1-b-Galgs 3 (reextraído) (5  $\mu$ L). Carril 4: pGAHFTEII 3 (reextraído) (5  $\mu$ L). B) Electroforesis de ligación I de la primera construcción. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (1  $\mu$ L). Carril 1. Reacción de ligación (7  $\mu$ L).

#### 7.3.2.4. Purificación de bandas de inserto y vector II

La electroforesis de las digestiones a escala preparativa de los plásmidos pCC1-b-GalgsE y pGAHFTEII (6.4.4.5), antes (panel A) y después (panel B) del corte de la banda, se muestra en la **Figura 62**.



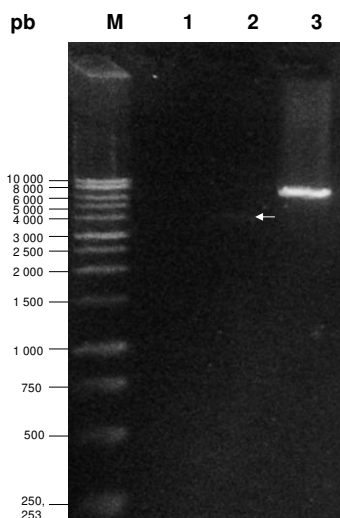
**Figura 62.** Electroforesis para purificación de bandas de inserto b-Galgs y vector pGAH II. A) Detalle del gel antes del corte de las bandas. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (1  $\mu$ L). Carril 1: Reacción de restricción a escala preparativa de pCC1-b-GalgsE + XhoI + NotI. B) Gel tras el corte de las bandas de inserto y vector, las flechas indican la posición aproximada de las bandas referidas en el texto. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (1  $\mu$ L). Carriles 1 y 2: reacción de restricción a escala preparativa de pCC1-b-GalgsE + XhoI + NotI. Carriles 3 y 4: Reacción de restricción a escala preparativa de pGAHFTEII + XhoI + NotI.

La banda correspondiente al inserto b-Galgs presentó un tamaño aparente de ~3200 pb, mayor al teórico de 2995 pb; la banda correspondiente al vector pGAH presentó un tamaño aparente de ~5000 pb, menor al teórico de 7499 pb. Se eligió esta banda, y no las bandas superiores, porque, a pesar de ser estas últimas más cercanas al tamaño real, la banda de ~5000 pb presentó la intensidad más cercana a la del fragmento de menor tamaño liberado por pGAHFTEII. De forma adicional, ya que las bandas del inserto b-Galgs (tamaño observado de ~3200 pb) y del fragmento más corto liberado por pGAHFTEII en la digestión (tamaño observado de ~800 pb) presentaron un tamaño menor al observado en las digestiones analíticas previas (~4000 y ~1050 pb respectivamente, como se muestra en la **Figura 60**), se asumió que la banda del vector pGAH pudo haber migrado en un tamaño menor al obtenido en digestiones analíticas previas (**Figura 60**), correspondiente en este caso a la banda de ~5000 pb, por lo cual no se emplearon las bandas de ~6000 y ~8000 pb obtenidas en la digestión de pGAHFTEII, aunque fueran más cercanas al tamaño teórico de pGAH de 7499 pb. Por los mismos motivos, a pesar de que en las digestiones



preparativas el inserto b-Galgs presentó un tamaño de ~3200 pb (relativamente cercano al teórico de 2995 pb), no es posible determinar su tamaño real.

En el análisis por electroforesis del inserto b-Galgs y el vector pGAH de la segunda purificación (**Figura 63**), se encontró que el inserto b-Galgs migró en un tamaño de ~4000 pb y el vector pGAH, en ~7000 pb. La recuperación del inserto b-Galgs por ambos métodos no fue suficiente para proseguir con la construcción del vector, por lo que se decidió realizar otra digestión preparativa del plásmido pCC1-b-GalgsE.

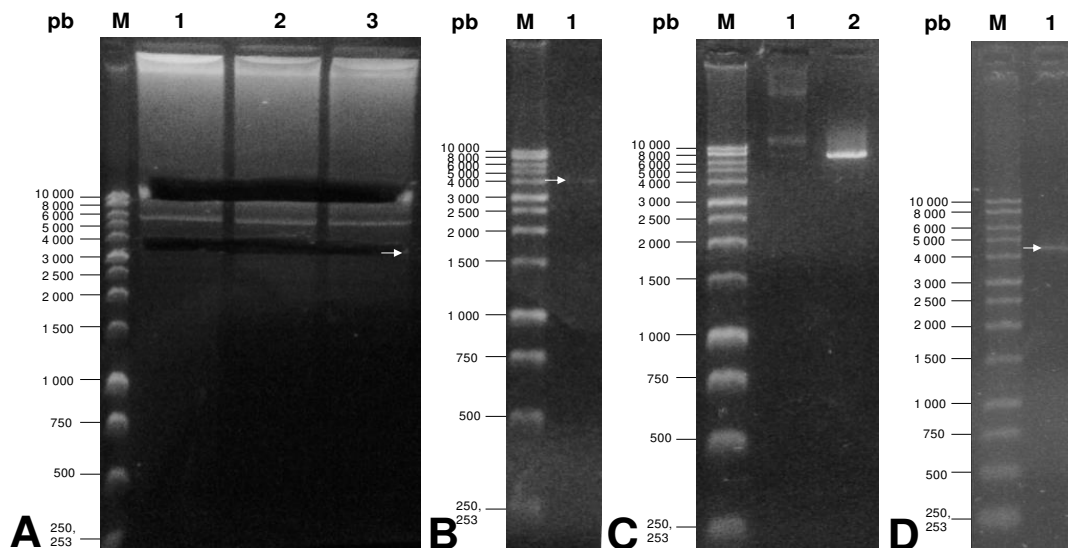


**Figura 63.** Electroforesis en gel de agarosa del segundo intento de purificación del inserto b-Galgs y el vector pGAH de la primera construcción. La purificación con kit hace referencia al uso del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (1  $\mu$ L). Carril 1: inserto b-Galgs purificado con método del algodón (3  $\mu$ L). Carril 2: inserto b-Galgs purificado con kit (3  $\mu$ L). Carril 3: vector pGAH purificado con kit (3  $\mu$ L). La flecha indica la posición de la banda.

### 7.3.2.5. Purificación de bandas de inserto (III) y ligación II del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la primera construcción

En la electroforesis, realizada bajo condiciones para disminuir la acción de nucleasas, de la reacción de digestión a escala preparativa del plásmido pCC1-b-Galgs (6.4.4.6) (**Figura 64**, panel A), el tamaño aproximado del inserto b-Galgs se encontró en los ~3000 pb. La electroforesis del inserto b-Galgs purificado (**Figura 64**, panel B) comprobó la calidad e integridad del inserto, sin embargo, el tamaño observado del inserto fue de ~4000 pb. Con este inserto purificado se llevó a cabo la reacción de ligación II (6.4.4.7), la cual se analizó por electroforesis en gel de agarosa (**Figura 64**, panel C),

usando como control el vector pGAH purificado empleado en la ligación. Se asumió que la ligación se llevó a cabo porque se observaron bandas de tamaño superior a la banda del vector. Las electroforesis empleadas para analizar el inserto se habían realizado con pre-tinción, por lo cual, al investigar que la post-tinción de los geles de agarosa permite determinar el tamaño de las bandas con mayor precisión, se realizó un análisis con esta técnica del inserto b-Galgs referido en este párrafo (**Figura 64**, panel D). El tamaño del inserto b-Galgs determinado por electroforesis con post-tinción (realizada durante el tercer intento de construcción de pGAHbGalgs) resultó ser de ~4500 pb, lo cual no concordó con el tamaño teórico del inserto (2995 pb), confirmando así la alteración de la secuencia del plásmido pCC1-b-Galgs extraído de *E. coli* EPI300 pCC1-b-Galgs.



**Figura 64.** Electroforesis del inserto y vector purificados y reacción de ligación II de la primera construcción. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (1  $\mu$ L). Las flechas indican la posición de la banda del inserto b-Galgs. A) Electroforesis de la purificación del inserto. Carriles 1 a 3: reacción de restricción a escala preparativa de pCC1-b-Galgs + XhoI + NotI. B) Electroforesis del inserto obtenido de la tercera purificación con kit. Carril 1: inserto b-Galgs de la tercera purificación (3  $\mu$ L). C) Electroforesis de la reacción de ligación II de la primera construcción. Carril 1: ligación II (5  $\mu$ L). Carril 2: vector pGAH de la segunda purificación (2  $\mu$ L) (control). D) Análisis por electroforesis en gel de agarosa con post-tinción del inserto purificado utilizado para la ligación II de la primera construcción. La tinción del gel se realizó sumergiendo el gel en GelRed 3X por 30 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 70 min, agarosa 0.8 Carril 1: inserto b-Galgs que se utilizó para la ligación en la primera construcción (9  $\mu$ L).

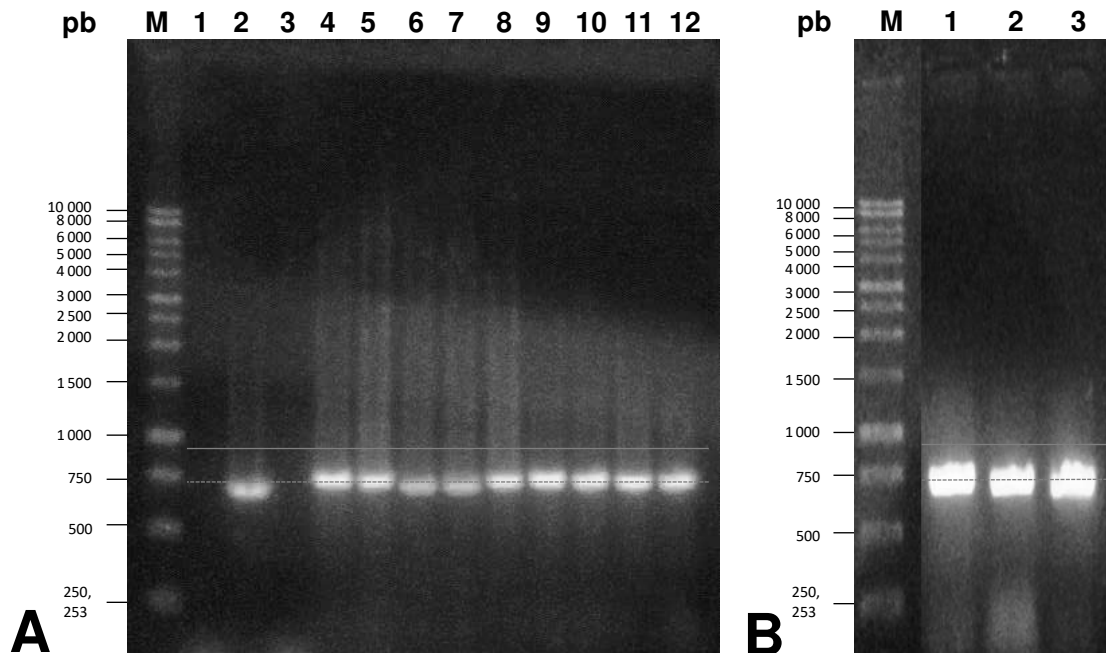
### 7.3.2.6. Transformación de *E. coli* TOP10 calciocompetente con la primera construcción de pGAHbGalgs (reacción de ligación II) y caracterización de las colonias obtenidas por PCR

La transformación de células de *E. coli* TOP10 calciocompetentes con 3  $\mu$ L de la reacción de ligación II (6.4.4.8) resultó en el crecimiento de 12 colonias (**Figura 65**).



**Figura 65.** Transformación de *E. coli* TOP10 calcio-competente con la ligación II de la primera construcción. A) Cultivo en agar LB + ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de las células transformadas con la ligación (12 colonias). B) Control de viabilidad celular. C) Control de susceptibilidad a ampicilina.

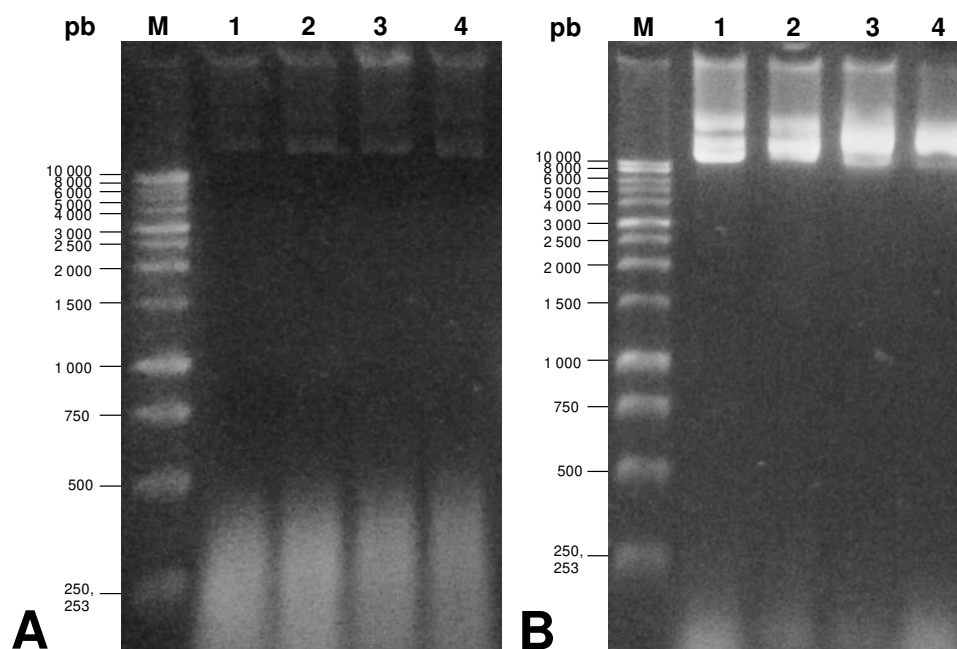
La caracterización por PCR con primers dirigidos al promotor (pGAPF) y a una secuencia interna del inserto (3BGALGS) de los plásmidos de las 12 colonias de *E. coli* analizadas (6.4.4.9) presentó un producto amplificado del mismo tamaño que el resultante en la PCR de la ligación (control positivo) (Figura 66). El control negativo y el plásmido pGAHFTEII no presentaron productos amplificados, como era esperado. Sin embargo, las bandas del producto amplificado por PCR de las colonias tenían un tamaño menor al esperado. Este fenómeno pudo deberse a la pre-tinción del gel, ya que en un ensayo posterior se hizo una electroforesis con post-tinción en la que se analizó la PCR del DNA plasmídico de la colonia 1, resultando una banda del producto amplificado con el tamaño esperado de 921 pb (ver Figura 79). Sin embargo, ya que en la caracterización por PCR, los plásmidos de las colonias de *E. coli* TOP10 presentaron amplificación con los oligonucleótidos específicos para comprobar la construcción del plásmido pGAHbGalgs, se asumió la identidad correcta del plásmido pGAHbGalgs.



**Figura 66.** Electroforesis de las PCR para caracterización de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con la ligación II de la primera construcción. La línea punteada señala el tamaño aproximado de las bandas obtenidas (750 pb), la línea continua señala el tamaño teórico que deberían presentar las bandas (921 pb). A) Caracterización de las colonias 1 a 9. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carril 1: control negativo de PCR. Carril 2: PCR de ligación II (1:5) (5  $\mu$ L). Carril 3: PCR de pGAHFTEII (1:10) (5  $\mu$ L). Carriles 4 a 12: PCR de DNA plasmídico (1:10) (5  $\mu$ L) extraído de las colonias 1 a 9, en ese orden. B) Caracterización de las colonias 10 a 12. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (1  $\mu$ L). Carriles 1 a 3: PCR de DNA plasmídico (1:10) (5  $\mu$ L) extraído de las colonias 10 a 12, en ese orden. La fotografía se editó para eliminar carriles irrelevantes.

### 7.3.2.7. Obtención del plásmido pGAHbGalgs (primera construcción) linealizado para la transformación de *P. pastoris* KM71

Los midipreps del plásmido pGAHbGalgs (de 10494 pb) a partir de cultivo de la colonia 1 de *E. coli* TOP10 transformada con la ligación II de la primera construcción, permitieron obtener la cantidad de plásmido necesaria para transformar a *P. pastoris* KM71 (~10  $\mu$ g). El análisis por electroforesis en gel de agarosa de las muestras de DNA plasmídico obtenidas (**Figura 67**, panel A), después del tratamiento con RNasa, su reextracción (**Figura 67**, panel B) y su cuantificación con nano-espectrofotómetro (**Tabla 92**), permitieron determinar que las muestras podían emplearse en la transformación.



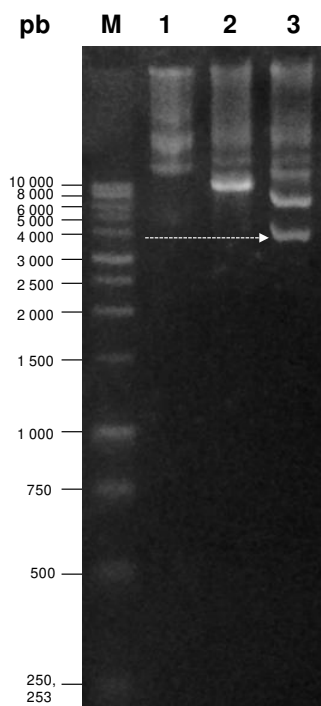
**Figura 67.** Electroforesis de muestras de DNA plasmídico pGAHbGalgs (primera construcción) a mediana escala. A) Muestras sin tratamiento. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.8  $\mu$ L). Carriles 1 a 4: extracciones de DNA plasmídico pGAHbGalgs a mediana escala, muestras 1 a 4 en ese orden (5  $\mu$ L). B) Muestras tratadas con RNasa y reextraídas. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.8  $\mu$ L). Carriles 1 a 4: reextracciones de DNA plasmídico pGAHbGalgs a mediana escala, muestras 1 a 4 en ese orden (5  $\mu$ L).

**Tabla 92.** Cuantificación de las muestras de DNA plasmídico pGAHbGalgs de la primera construcción a mediana escala después del tratamiento con RNasa y la reextracción.

Muestra	Concentración de dilución 1:10 (ng/ $\mu$ L)	Concentración total (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
1	50	500	1.818	1.538
2	25	250	1.667	1.429
3	55	550	1.571	2.000
4	65	650	1.733	1.733

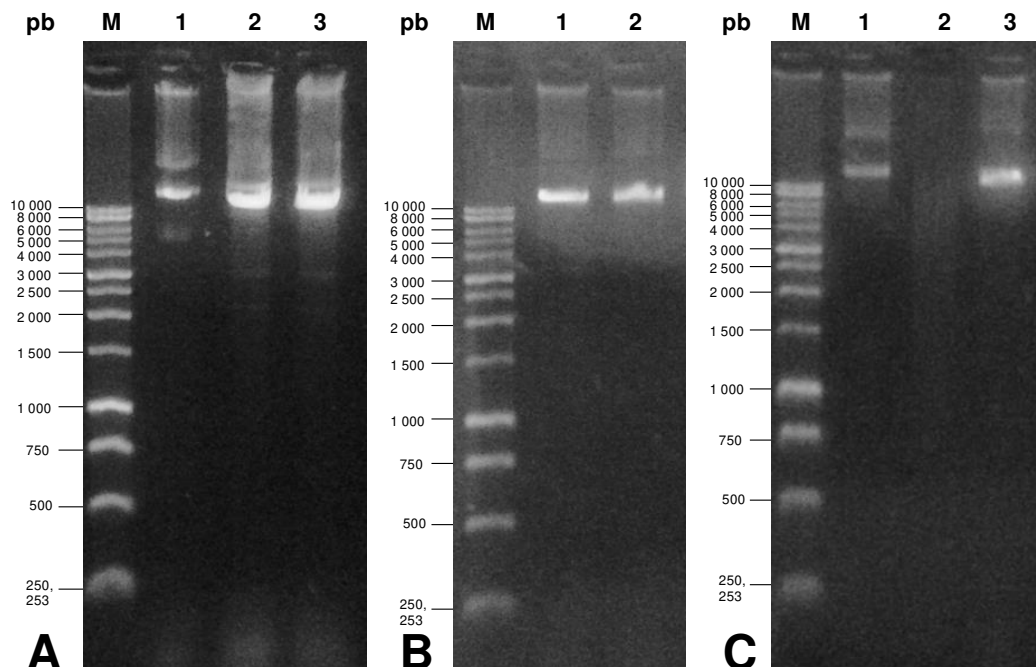
Muestras en el mismo orden que en la electroforesis.

Las reacciones de restricción a escala analítica para caracterizar el plásmido pGAHbGalgs con las enzimas de restricción XhoI y NotI, y para comprobar su linealización con la enzima de restricción SalI (**Figura 68**), demostraron que era posible la linealización con SalI, al obtener una banda superior a 10000 pb, siendo que el tamaño esperado era de 10494 pb. Sin embargo, la caracterización con XhoI y NotI mostró que la banda de inserto b-Galgs liberada no coincidía con el tamaño teórico esperado de 2995 pb, debido a que se observó en un tamaño de ~4000 pb. Se asumió que la diferencia de tamaño se debió a problemas con la electroforesis con pre-tinción.



**Figura 68.** Digestiones analíticas de pGAHbGalgs (primera construcción). Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.8  $\mu$ L). Carril 1: reextracción de DNA plasmídico pGAHbGalgs a mediana escala, muestra 1 (3  $\mu$ L). Carril 2: Caracterización de pGAHbGalgs por restricción con Sall (7  $\mu$ L). Carril 3: caracterización de pGAHbGalgs por restricción con XhoI + NotI (7  $\mu$ L). La flecha indica la posición de la banda del inserto b-Galgs.

El análisis por electroforesis de los resultados los procesos para obtener el plásmido pGAHbGalgs linealizado con Sall (**6.4.4.10.3**) y concentrado (**6.4.4.10.4**) se muestran en la **Figura 69**, y la cuantificación de las digestiones preparativas de pGAHbGalgs en las distintas etapas del proceso se muestran en la **Tabla 93**. De las dos reacciones preparadas, se empleó la reacción “75” para la transformación de *P. pastoris* KM71, debido a que la reacción “90” se degradó.



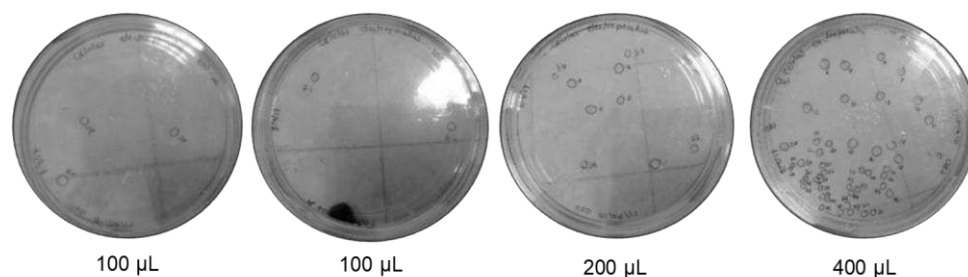
**Figura 69.** Obtención de pGAHbGalgs (primera construcción) linealizado con Sall y concentrado. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.8  $\mu$ L). A) Electroforesis de digestiones preparativas de pGAHbGalgs de la primera construcción con Sall. Carril 1: mezcla de las muestras 1 y 2 de reextracciones de DNA plasmídico pGAHbGalgs a mediana escala, sin digerir (2  $\mu$ L). Carril 2: digestión “90” (6  $\mu$ L). Carril 3: digestión “75” (6  $\mu$ L). B) Digestiones preparativas de pGAHbGalgs con Sall tras limpieza y concentración con unidades de filtración Millipore. Carril 1: digestión “90” (2  $\mu$ L) Carril 2: digestión “75” (2  $\mu$ L). C) Digestiones preparativas de pGAHbGalgs con Sall tras concentración con Thermomixer o CentriVap. Carril 1: mezcla de las muestras 1 y 2 de reextracciones de DNA plasmídico pGAHbGalgs a mediana escala, sin digerir (2  $\mu$ L). Carril 1: digestión “90” concentrada en Thermomixer, diluida 1:10 (2  $\mu$ L). Carril 2: digestión “75” concentrada en CentriVap, diluida 1:10 (2  $\mu$ L).

**Tabla 93.** Cuantificación de las digestiones preparativas de pGAHbGalgs de la primera construcción con Sall.

Digestión	Directa			Concentrado y limpiado con cartuchos			Concentrado con Thermomixer o CentriVap		
	Conc. (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Conc. (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Conc. 1:10 (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
90	195	1.560	1.300	73.5	1.750	0.875	49.5	1.868	0.943
75	170	1.581	1.360	72.5	1.747	0.906	98	1.719	0.800

### 7.3.2.8. Obtención de *P. pastoris* KM71bGalgs de la primera construcción y caracterización por PCR

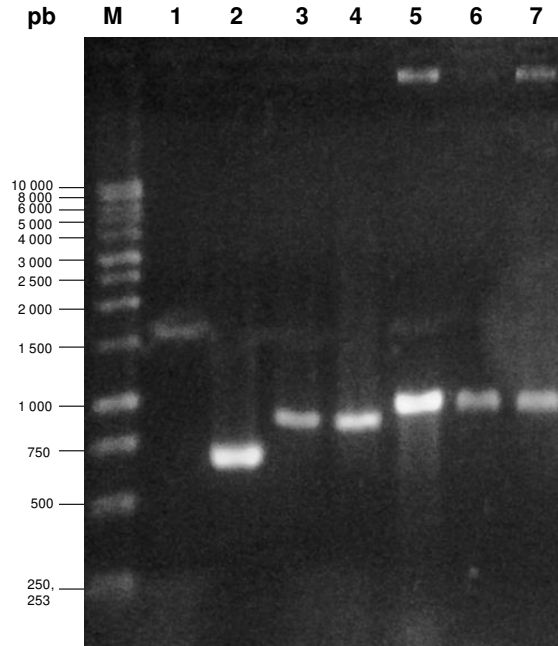
La transformación de células electrocompetentes de *P. pastoris* KM71 (6.4.4.11), resultó en la obtención de 63 colonias en las placas de RDB sin histidina sembradas con las células sometidas a electroporación (Figura 70). El control negativo en RDB sin histidina de las células sin electroporar mostró el crecimiento de una colonia.



**Figura 70.** Placas de agar RDB sin histidina sembradas con las células de *P. pastoris* KM71 sometidas a electroporación con el plásmido pGAHbGalgs (primera construcción) linealizado con SallI. Los números bajo la placa muestran el volumen de la suspensión de células sembrado.

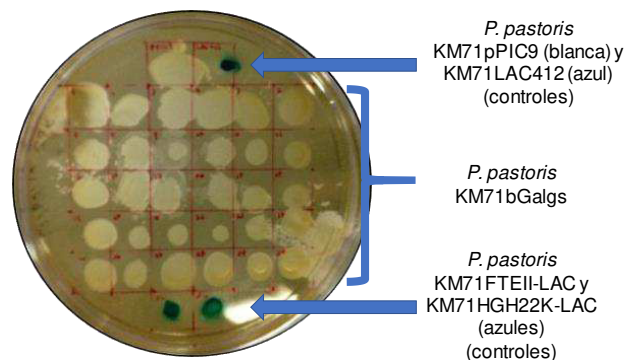
La caracterización mediante PCR con los oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS de cinco colonias resultantes de la transformación de *P. pastoris* KM71 con el plásmido pGAHbGalgs de la primera construcción (6.4.4.12) confirmó la integración del plásmido pGAHbGalgs en el genoma de la levadura, evidenciado por el producto amplificado esperado con un tamaño cercano al teórico de 921 pb (**Figura 71**). Sin embargo, en el PCR de la ligación (control positivo), el producto amplificado presentó un tamaño de ~700 pb, cuando el teórico es de 921 pb. Esto indica que se presentó el mismo fenómeno discutido previamente en las caracterizaciones por PCR de las colonias de *E. coli* TOP10 pGAHbGalgs (**Figura 66**), en el que el tamaño de las bandas no corresponde al tamaño real en las electroforesis con pre-tinción (este problema se solucionó en análisis subsecuentes realizando la post-tinción de la electroforesis, ver como ejemplo la **Figura 79**).





**Figura 71.** Caracterización mediante PCR con oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS de clonas de *P. pastoris* KM71 transformadas con el plásmido pGAHbGalgs de la primera construcción. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.8  $\mu$ L). Carril 1: control negativo (3  $\mu$ L). Carril 2: control positivo (dilución 1:10 de ligación II) (3  $\mu$ L). Carriles 3 a 7: PCR de lisado de clonas 1 a 5 (en ese orden) (3  $\mu$ L).

La caracterización fenotípica de colonias de *P. pastoris* KM71 transformadas con el plásmido pGAHbGalgs de la primera construcción, mediante los ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa descritos previamente (6.4.4.13), resultó en la ausencia de actividad enzimática. No se presentó desarrollo de color en los ensayos de actividad con ONPG a distintas condiciones de temperatura y pH. La ausencia de actividad conllevó a la caracterización de 30 clonas mediante un cultivo en placa con el reactivo X-gal, en los que no se detectó actividad de  $\beta$ -galactosidasa en ninguna de las colonias caracterizadas ni en el control negativo (cepa KM71pPIC9), caso contrario a los controles positivos (cepas KM71LAC412, KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC) que sí desarrollaron la coloración azul esperada debido a la actividad de  $\beta$ -galactosidasa (**Figura 72**).



**Figura 72.** Caracterización fenotípica de las células de *P. pastoris* KM71 pGAHbGalgs provenientes de la segunda transformación mediante cultivo en agar YPD con X-gal.

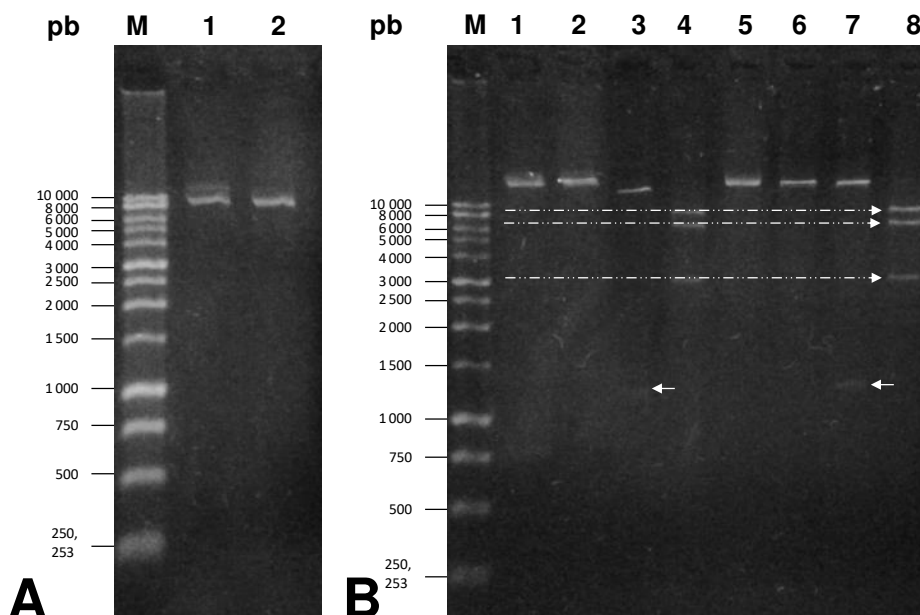
### 7.3.3. Segunda construcción del plásmido pGAHbGalgs

#### 7.3.3.1. Caracterización del plásmido pCC1-b-GalgsL por análisis de restricción

Debido a que en el primer intento de obtención de la cepa de *P. pastoris* KM71bGalgs no se logró detectar la actividad enzimática de  $\beta$ -galactosidasa a pesar de mostrar la integración de pGAHbGalgs en el genoma, se realizó un segundo intento de construcción del plásmido pGAHbGalgs. Para la segunda construcción, se partió de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido liofilizado pCC1-b-Galgs (pCC1-b-GalgsL), a diferencia de la primera construcción en la que se empleó el plásmido pCC1-b-GalgsE, que presentaba alteraciones en el tamaño según lo evidenció el tamaño del inserto b-Galgs (**Figura 64**, panel D) y las caracterizaciones que se discutirán en un apartado posterior (**6.4.6**). El plásmido pCC1-b-GalgsL fue secuenciado por GenScript, por lo que teóricamente no presentaba alteraciones en su secuencia.

Los plásmidos pCC1-b-GalgsL de las colonias 1 y 2 de *E. coli* TOP10 pCC1-b-GalgsL extraídos con el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Cat. A1330) (**6.4.5.1**), los cuales se emplearon para la caracterización, no presentaron degradación ni contaminación por RNA (**Figura 73**, panel A). La caracterización de dichos plásmidos con las enzimas de restricción XhoI, EcoRI y BglII (**6.4.5.2**) mostró el número de fragmentos correspondiente los resultados teóricos (**Tabla 94**). Sin embargo, las bandas resultantes presentaron un tamaño superior al teórico. Particularmente, en la caracterización con BglII se esperaban fragmentos de tamaños 5040, 3971 y 2067 pb, mientras que la electroforesis mostró fragmentos de ~9000, ~7000

y ~3000 pb; de igual manera, la restricción con EcoRI debió liberar un fragmento de ~864 pb del plásmido, mientras que en el gel el tamaño de la banda se encontró alrededor de ~1200 pb (**Figura 73**, panel B). La diferencia pudo deberse a la pre-tinción de la electroforesis.



**Figura 73.** Extracción y caracterización de plásmido pCC1-b-GalgsL empleado en la segunda construcción. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L) A) Extracción de plásmido con kit de las colonias 1 y 2 de *E. coli* TOP10 transformadas con pCC1-b-GalgsL. Carriles 1 y 2: minipreps de pCC1-b-GalgsL extraídos con kit de las colonias 1 y 2, respectivamente (5  $\mu$ L). B) Caracterización mediante enzimas de restricción de los plásmidos pCC1-b-GalgsL extraídos con kit de las colonias 1 (carriles 1 a 4) y 2 (carriles 5 a 8). Carriles 1 y 5: plásmido sin enzima (5  $\mu$ L). Carriles 2 y 6: plásmido + XhoI (10  $\mu$ L). Carriles 3 y 7: plásmido + EcoRI (10  $\mu$ L). Carriles 4 y 8: plásmido + BglII (10  $\mu$ L).

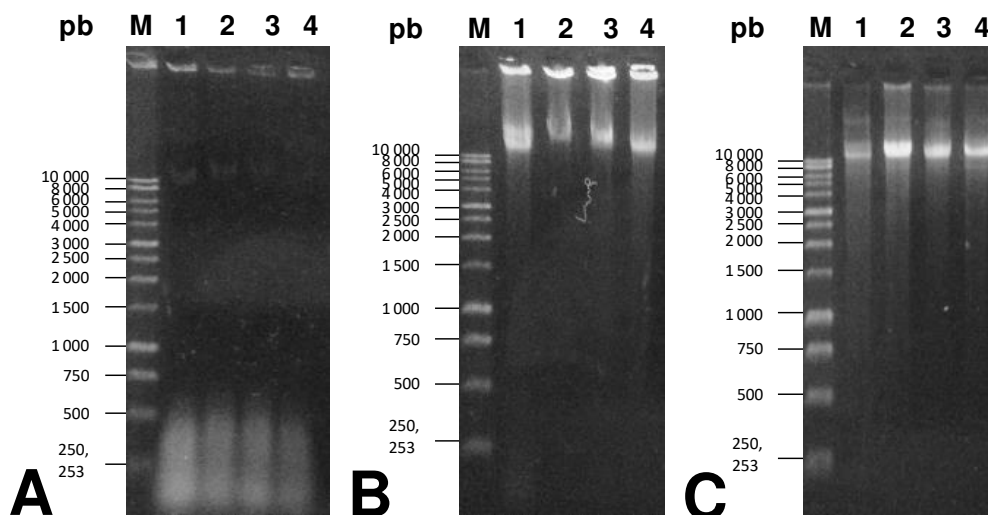
**Tabla 94.** Resultados teóricos de la caracterización con enzimas de restricción del plásmido pCC1-b-Galgs.

Enzima de restricción	XhoI	EcoRI	BglII
Número teórico de fragmentos	1	2	3
Tamaños teóricos de fragmentos	11078	10214, 864	5040, 3971, 2067

### 7.3.3.2. Aislamiento de plásmido pCC1-b-GalgsL a mediana escala

Las muestras de midiprep de las colonias 1 y 2 de *E. coli* TOP10 pCC1-b-GalgsL (6.4.5.3), según el análisis por electroforesis (**Figura 74**, panel A), presentaron RNA y una baja concentración de DNA, lo último posiblemente ocasionado por contaminantes que aumentaron la viscosidad de las muestras y dificultaron su el depósito en el gel. El tratamiento con RNasa y la reextracción de las muestras aumentó la concentración visible

del DNA y eliminó el RNA (**Figura 74**, panel B), sin embargo, la cuantificación y verificación de calidad por espectrofotometría mostró una relación  $A_{260/280}$  menor a 1.8 en las muestras (**Tabla 95**), llegando a un mínimo de 1.067 e indicando contaminación por proteínas, evidenciada además por la retención de muestra en los pocillos del gel (**Figura 74**, panel B). El procesamiento con un kit de reextracción mejoró la calidad, aumentando la relación  $A_{260/280}$  a valores cercanos a 1.8 (**Figura 74**, panel C; **Tabla 95**).



**Figura 74.** Obtención de plásmido pCC1-b-GalgsL para la segunda clonación. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.8  $\mu$ L). Carriles 1 a 4: pCC1-b-GalgsL de colonia 1 (preparaciones A y B) y colonia 2 preparaciones A y B), en ese orden (5  $\mu$ L) A) Preparaciones de DNA plasmídico obtenidas por mediana escala. B) Preparaciones de DNA plasmídico obtenidas por mediana escala y reextraídas (el carril 1 presenta una dilución 1:10). C) Preparaciones de DNA plasmídico de mediana escala, reextraídas y purificadas con kit.

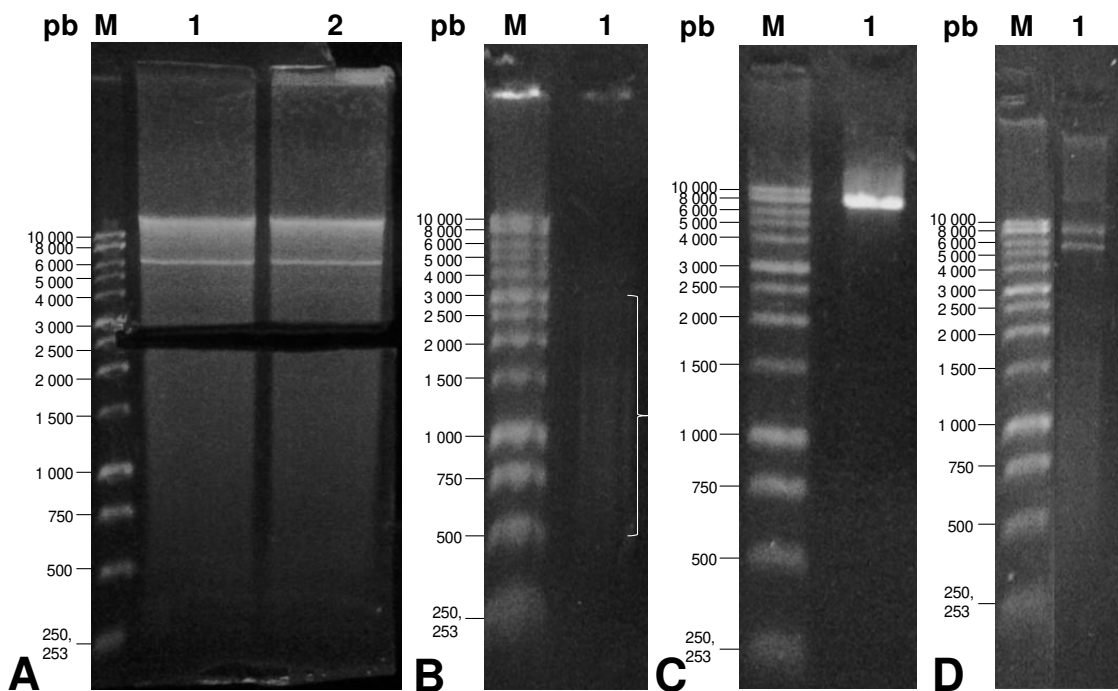
**Tabla 95.** Cuantificación de muestras de mediana escala de pCC1-b-GalgsL en la segunda construcción.

Origen del plásmido	Muestras reextraídas			Muestras reextraídas, purificadas con kit		
	Concentración (ng/ $\mu$ L) (1:10)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	Concentración (ng/ $\mu$ L)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Colonia 1 A	47.5	1.696	1.638	28.5	1.676	2.478
Colonia 1 B	8.0	1.067	0.533	50.0	1.786	1.923
Colonia 2 A	4.5	1.125	0.818	55.5	1.734	2.220
Colonia 2 B	7.5	1.154	0.500	39.5	1.756	2.548

### 7.3.3.3. Purificación de bandas de inserto y ligación del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la segunda construcción

La reacción de restricción a escala preparativa del plásmido pCC1-b-GalgsL de la colonia 2 (preparación A) (**6.4.5.3**) mostró que el inserto b-Galgs migró en un tamaño comprendido entre 2500 y 3000 pb (**Figura 75**, panel A), coincidiendo con el tamaño

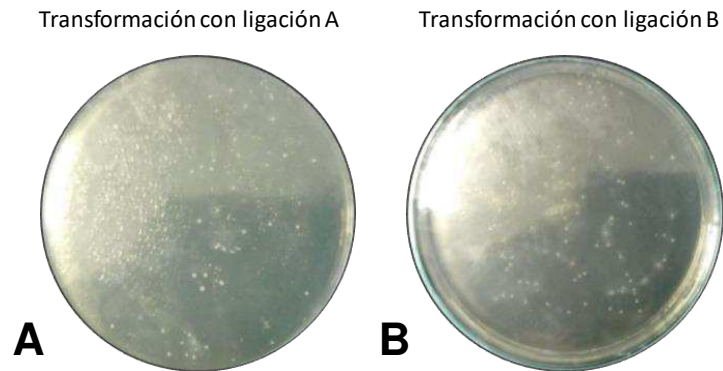
esperado de 2995 pb. El análisis por electroforesis del inserto b-Galgs purificado mostró degradación de la muestra (**Figura 75**, panel B), sin embargo, a pesar de su estado, el inserto se empleó en la ligación (a pesar de la degradación, con lo cual la relación inserto:vector, no se respetó). El vector pGAH purificado que se empleó en el primer intento de construcción de pGAHbGalgs continuó íntegro (**Figura 75**, panel C) pese a haber transcurrido dos meses desde su obtención, por lo que se empleó para la ligación. El análisis por electroforesis de la ligación A, en la que por error se empleó otro buffer de ligación (otro error en el protocolo), mostró al menos otra banda además de la del vector (**Figura 75**, panel D). Por lo tanto, se asumió que hubo ligación y se procedió con la transformación.



**Figura 75.** Obtención y verificación de calidad del inserto b-Galgs y el vector pGAH empleados en la segunda construcción de pGAHbGalgs. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (1  $\mu$ L en A y 0.8  $\mu$ L en B, C y D). A) Electroforesis para purificación de inserto b-Galgs para la segunda construcción. Carriles 1 y 2: digestión preparativa del plásmido pCC1-b-Galgs (muestra de la colonia 2 A) con XhoI y NotI, después de haber cortado la banda del inserto b-Galgs. B) Verificación de la integridad del inserto b-Galgs purificado. Carril 1: inserto b-Galgs purificado con kit (3  $\mu$ L). La llave indica el tamaño aproximado del barrido de degradación de DNA. C) Verificación de la integridad del vector pGAH purificado durante el primer intento de construcción de la cepa. Carril 1: vector pGAH purificado con kit (2  $\mu$ L). D) Verificación de ligación para la segunda construcción de pGAHbGalgs. Carril 1: reacción de ligación A (5  $\mu$ L). Se eliminaron los carriles con muestras irrelevantes de este gel.

#### 7.3.3.4. Transformación de *E. coli* TOP10 calciocompetente con la segunda construcción de pGAHbGalgs y caracterización de las colonias obtenidas por PCR

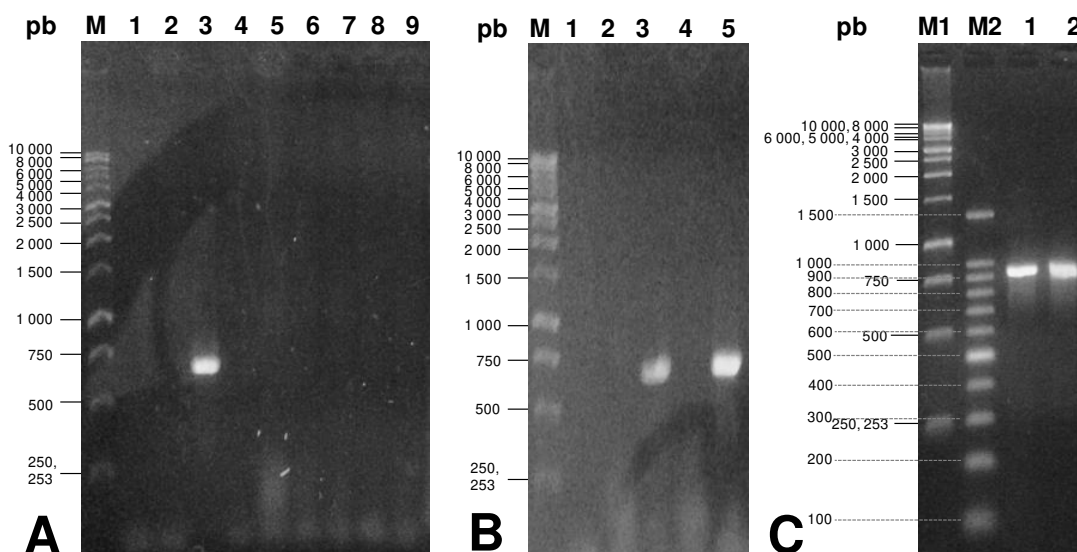
Los resultados de las transformaciones de *E. coli* TOP10 con las ligaciones A y B mostraron crecimiento de colonias en las placas en la que se sembraron las células transformadas con cada una de ligaciones (**Figura 76**). Se presentó un gran número de colonias rodeadas con colonias satélite en ambas placas.



**Figura 76.** Resultado de la transformación de *E. coli* TOP10 con las ligaciones A y B del inserto b-Galgs y el vector pGAH de la segunda construcción.

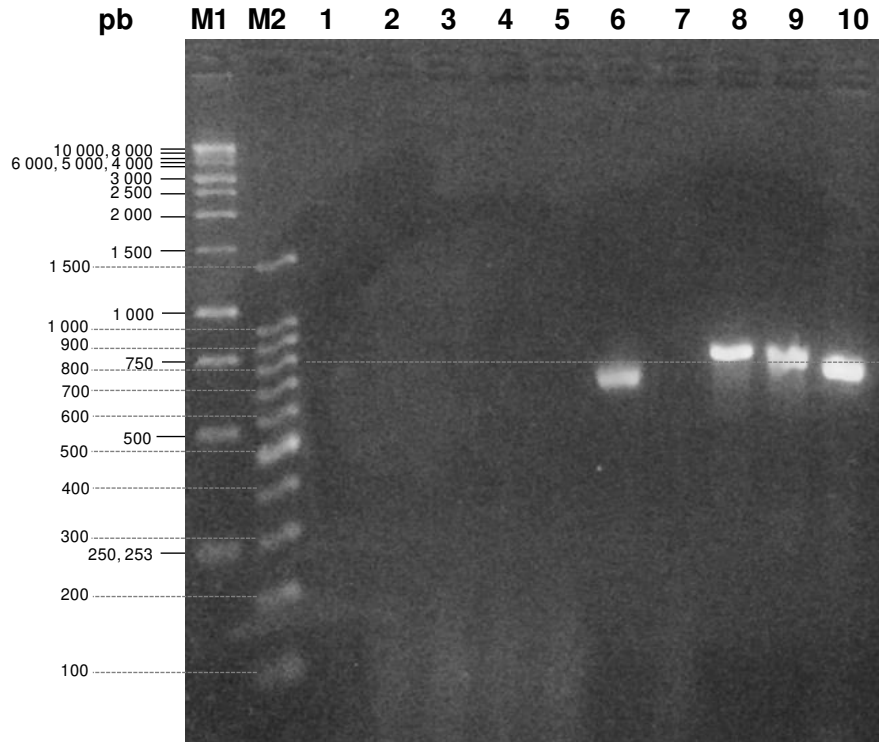
La caracterización mediante PCR con los oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS de las colonias resultantes de la transformación con las ligaciones A y B de la segunda construcción (**6.4.5.9**), demostró que ninguna de las seis colonias que se eligieron al principio se transformó con el plásmido pGAHbGalgs (**Figura 77**, panel A), y que al menos una de las colonias seleccionadas de la ligación B, pero ninguna de las colonias seleccionadas de la ligación A y ninguna de las colonias del conjunto S (con colonias satélites) se transformó con el plásmido pGAHbGalgs (**Figura 77**, panel B). El tamaño del producto amplificado por PCR presentó el mismo comportamiento descrito anteriormente en los ensayos de caracterización de la primera construcción de pGAHbGalgs, en donde la banda amplificada, cuyo tamaño teórico es de 921 pb, migró en un tamaño de ~600 pb relativo al marcador. Un análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % empleando dos marcadores de tamaño molecular distintos permitió confirmar discrepancias entre los mismos al momento de la migración, ya que se cargó el mismo volumen de ambos marcadores con el mismo volumen de buffer de carga y de agente de tinción GelRed. Con esta electroforesis se confirmó que el tamaño del producto

de las amplificaciones del conjunto de colonias de la ligación B y de la ligación B relativo al nuevo marcador empleado sí correspondía al tamaño teórico (**Figura 77**, panel C).



**Figura 77.** Caracterización por PCR con oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS de plásmidos de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con las ligaciones de la segunda construcción. A) Caracterizaciones de colonias 1A, 2A, 3A, 1B, 2B, 3B. Se depositaron 5  $\mu$ L de cada PCR. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carril 1: control negativo. Carril 2: PCR pGAHFTEII. Carril 3: PCR pGAHbGalgs (primera construcción). Carril 4: PCR colonia 1A. Carril 5: PCR colonia 2A. Carril 6: PCR colonia 3A. Carril 7: PCR colonia 1B. Carril 8: PCR colonia 2B. Carril 9: PCR colonia 3B. B) Caracterizaciones de conjuntos de colonias. Se depositaron 5  $\mu$ L de cada PCR. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carril 1: Control negativo. Carril 2: PCR de conjunto A. Carril 3: PCR de conjunto B. Carril 4: PCR de conjunto S. Carril 5: PCR de ligación B. C) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en la cual se evidencia la alteración en la migración en bandas menores a 1500 pb, debida posiblemente a la pre-tinción con GelRed. Carril M1: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carril M2: marcador 100 bp (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carril 1: PCR de conjunto de colonias resultante de la ligación B (dilución 1:10, 2  $\mu$ L). Carril 2: PCR de ligación B (dilución 1:10, 2  $\mu$ L).

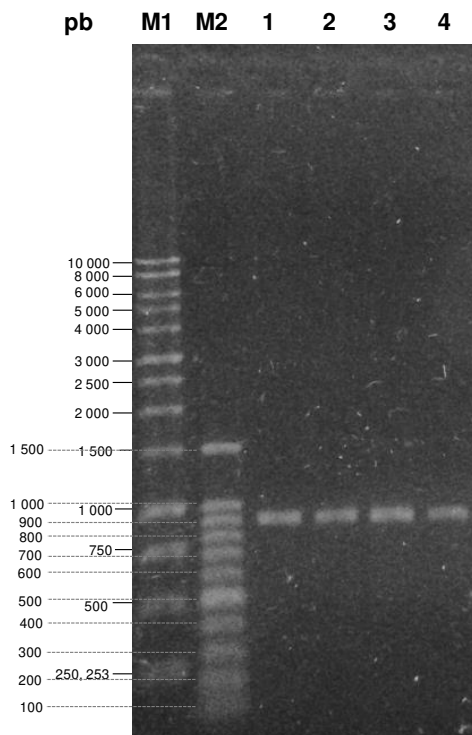
Las caracterizaciones por PCR de los plásmidos del resto de las colonias seleccionadas transformadas con la ligación B confirmaron la presencia del plásmido pGAHbGalgs en la colonia 8B, así como en las ligaciones A y B (**Figura 78**), a pesar de que ninguna de las colonias seleccionadas que se transformó con la ligación A tenía el plásmido. Sin embargo, a diferencia del tamaño relativo presentado por las muestras en el panel C de la **Figura 77**, la caracterización de las mismas muestras en la **Figura 78** presentaron un tamaño de ~800 pb de acuerdo con el marcador 100 bp Ladder (Promega), evidenciando la variación en los tamaños de las bandas en las electroforesis con pre-tinción.



**Figura 78** Caracterización por PCR con oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS de plásmidos de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con la ligación B de la segunda construcción. Agarosa al 1.5 %. Se depositaron 2  $\mu$ L de cada reacción de PCR. La línea punteada sirve como apoyo para determinar el tamaño de las bandas. Carril M1: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carril M2: marcador 100 bp Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carril 1: control negativo. Carril 2: PCR de colonia 4B. Carril 3: PCR de colonia 5B. Carril 4: PCR de colonia 6B. Carril 5: PCR de colonia 7B. Carril 6: PCR de colonia 8B. Carril 7: PCR de colonia 9B. Carril 8: PCR de ligación A. Carril 9: PCR de ligación B. Carril 10: PCR contra DNA genómico de la clona 1 de *P. pastoris* pGAHbGalgs de la primera construcción.

El análisis mediante electroforesis con post-tinción de reacciones PCR previas con los oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS (**Figura 79**), demostró que la electroforesis con pre-tinción afectó la migración del DNA. Los dos marcadores empleados en la electroforesis migraron en los tamaños correspondientes a cada uno y sin presentar diferencias entre estos, caso contrario a lo mostrado en el panel C de la **Figura 77** y en la **Figura 78**. El tamaño de los productos amplificados por PCR según la electroforesis con post-tinción coincidió con el tamaño teórico de 921 pb, sin presentar variaciones entre las bandas, a diferencia de lo mostrado en la **Figura 78**.

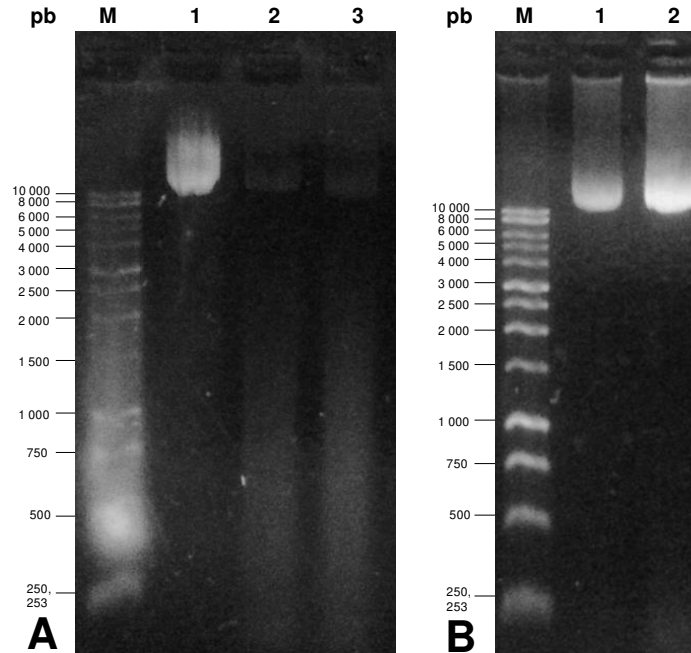




**Figura 79.** Electroforesis con post-tinción de PCR previas para comprobación de tamaños de amplicones. Todas las reacciones se realizaron con los oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS. Se depositó 1  $\mu$ L de una dilución 1:10 de la respectiva PCR. La tinción del gel se realizó sumergiendo el gel en GelRed 3X por 30 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 80 min, agarosa 1.5 %. Carril M1: marcador 1 kb Ladder (Promega). Carril M2: marcador 100 bp Ladder (Promega). Carril 1: PCR de colonia 8B (**Figura 78**, carril 6). Carril 2: PCR de mezcla B (**Figura 77**, panel B, carril 3). Carril 3: PCR de colonia 1 de *E. coli* pGAHbGalgs de la primera construcción (**Figura 66**, carril 4). Carril 4: PCR contra DNA genómico de *P. pastoris* pGAHbGalgs de la primera construcción (**Figura 71**, carril 3, y **Figura 78**, carril 10).

### 7.3.3.5. Obtención del plásmido pGAHbGalgs (segunda construcción) linealizado para la transformación de *P. pastoris* KM71

Se eligió la colonia 8B como origen del plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción. Las muestras de DNA plasmídico obtenidas por extracción a mediana escala de pGAHbGalgs presentaron una baja concentración según el análisis por electroforesis en gel de agarosa (**Figura 80**, panel A), por lo que se reextrajeron con solventes orgánicos. Después de la reextracción (**Figura 80**, panel B; **Tabla 96**), las muestras de pGAHbGalgs presentaron una concentración y calidad adecuadas para la reacción de digestión a escala preparativa con SalI.

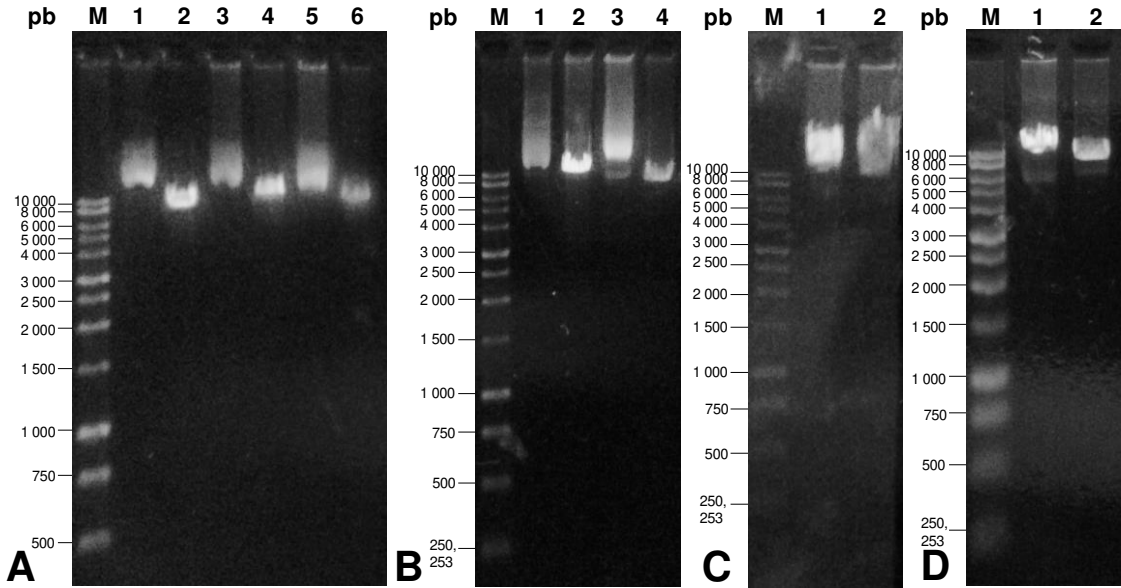


**Figura 80.** Obtención de plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción. A) Extracciones del plásmido pGAHbGalgs a mediana escala. Carril M: 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carril 1: miniprep pGAHbGalgs extraído con kit (3  $\mu$ L). Carril 2: midiprep pGAHbGalgs 1 (5  $\mu$ L). Carril 3: midiprep pGAHbGalgs 2 (5  $\mu$ L) B) Reextracciones de midipreps de pGAHbGalgs. Carril M: 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L) Carril 1: pGAHbGalgs 1 (2  $\mu$ L, dilución 1:10). Carril 2: pGAHbGalgs 2 (2  $\mu$ L, dilución 1:10).

**Tabla 96.** Cuantificación de muestras reextraídas de mediana escala de pGAHbGalgs de la segunda construcción.

Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ L) Dilución 1:10	Concentración (ng/ $\mu$ L) Original	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
pGAHbGalgs 1 (reextraído)	179	1790	1.721	2.057
pGAHbGalgs 2 (reextraído)	735	7350	1.760	2.115

La reacción de restricción a escala analítica de las muestras comprobó la linealización de las muestras con la enzima SalI (**Figura 81**, panel A). Una vez comprobada, se procedió a la reacción de restricción con SalI a escala preparativa de las muestras de pGAHbGalgs de mediana escala (**6.4.5.8.2**). Las digestiones mostraron DNA no degradado (**Figura 81**, panel B). Los análisis por electroforesis y espectrofotometría de las digestiones tras la concentración y purificación con cartuchos Millipore (**6.4.5.8.3**) mostraron DNA no degradado, pero en concentración inferior a la requerida (**Figura 81**, panel C, **Tabla 97**), por lo que se concentraron empleando el equipo CentriVap, resultando en DNA plasmídico no degradado y en una concentración mayor a 1  $\mu$ g/mL (**Figura 81**, panel D, **Tabla 97**).



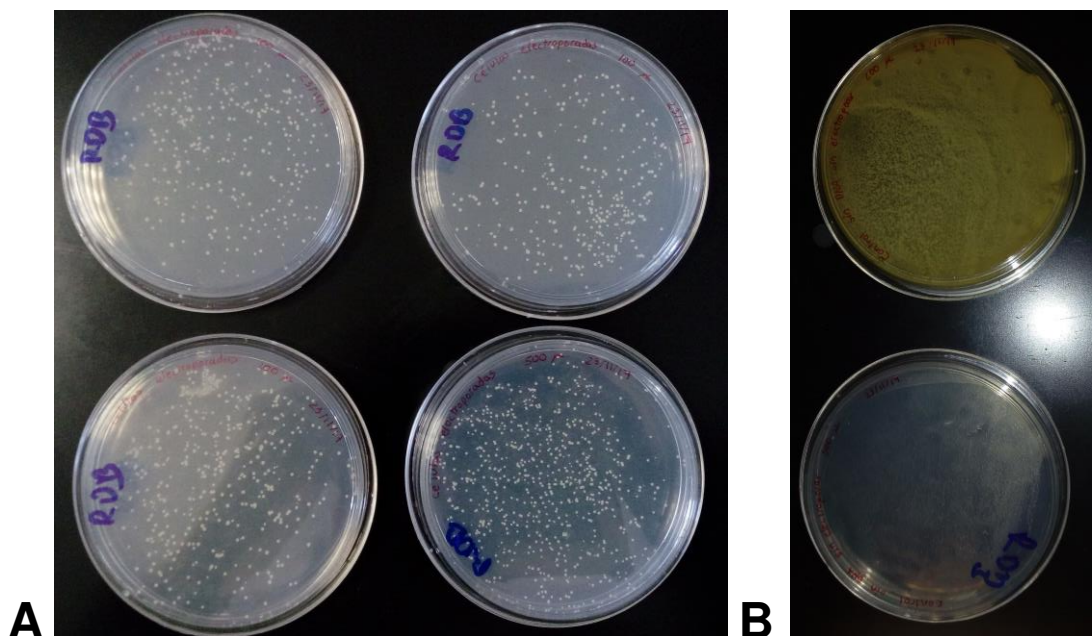
**Figura 81.** Obtención de pGAHbGalgs de la segunda construcción linealizado con Sall y concentrado. Carril M: 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L) A) Reacciones de restricción analíticas de pGAHbGalgs de la segunda construcción con Sall. Carril 1: miniprep pGAHbGalgs extraído con kit (1  $\mu$ L). Carril 2: digestión de miniprep pGAHbGalgs extraído con kit + Sall (4  $\mu$ L). Carril 3: midiprep pGAHbGalgs 1 (1  $\mu$ L). Carril 4: digestión de midiprep pGAHbGalgs 1 + Sall (1  $\mu$ L). Carril 5: midiprep pGAHbGalgs 2 (1  $\mu$ L). Carril 6: digestión de midiprep pGAHbGalgs 2 + Sall (1  $\mu$ L). B) Reacciones de restricción a escala preparativa de pGAHbGalgs de la segunda construcción con Sall (diluciones 1:10). Carril 1: midiprep pGAHbGalgs 1 (5  $\mu$ L). Carril 2: digestión pGAHbGalgs 1 + Sall (5  $\mu$ L). Carril 3: pGAHbGalgs 2 (reextraído) (5  $\mu$ L). Carril 4: digestión pGAHbGalgs 2 + Sall (5  $\mu$ L, dilución 1:10) C) Reacciones de restricción a escala preparativa de pGAHbGalgs de la segunda construcción con Sall, purificadas con cartucho Millipore. Carril 1: pGAHbGalgs 1 linealizado con Sall (3  $\mu$ L, dilución 1:10). Carril 2: pGAHbGalgs 2 linealizado con Sall (3  $\mu$ L, dilución 1:10) D) Reacciones de restricción a escala preparativa de pGAHbGalgs de la segunda construcción con Sall purificadas con cartucho Millipore y concentradas (diluciones 1:10). Carril 1. pGAHbGalgs 2a linealizado con Sall y concentrado (1  $\mu$ L). Carril 2: pGAHbGalgs 2b linealizado con Sall y concentrado (1  $\mu$ L).

**Tabla 97.** Cuantificación de pGAHbGalgs de la segunda construcción linealizado con Sall y concentrado.

Muestra	Concentración	Concentración	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
	(ng/ $\mu$ L) Dilución 1:10	(ng/ $\mu$ L) Original		
pGAHbGalgs 1 linealizado con Sall purificado con cartucho Millipore	57.0	570	1.781	2.375
pGAHbGalgs 2 linealizado con Sall purificado con cartucho Millipore	50.5	505	1.772	2.525
pGAHbGalgs 2a linealizado con Sall y concentrado	124	1240	1.777	2.225
pGAHbGalgs 2b linealizado con Sall y concentrado	125	1250	1.773	2.252

### 7.3.3.6. Transformación de *P. pastoris* KM71 con el plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción

La transformación de *P. pastoris* KM71 con el plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción linealizado con Sall resultó en un mayor número de colonias transformantes (**Figura 82**) en comparación con el primer intento de transformación. Mientras que en la transformación con el plásmido de la primera construcción se obtuvieron 67 colonias en total, en las placas sembradas con 100  $\mu$ L de células electroporadas de la segunda transformación crecieron alrededor de 300 colonias. El control negativo comprobó que las células sin transformar no podían crecer en medio sin histidina, ya que no se obtuvo ninguna colonia en esta placa.

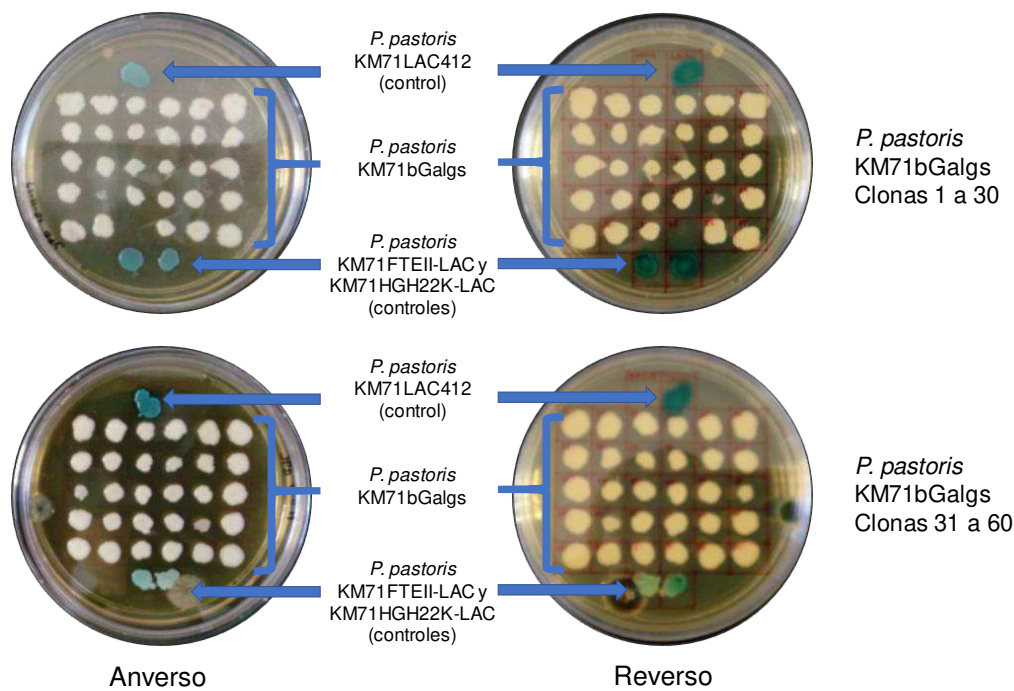


**Figura 82.** Transformación de *P. pastoris* KM71 electrocompetente con el plásmido pGAHbGalgs de la segunda construcción linealizado con Sall. A) Placas de agar RDB sin histidina sembradas con distintos volúmenes de las células electroporadas. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: 100  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 500  $\mu$ L. B) Controles de la transformación. Arriba: control de viabilidad en agar YPD. Abajo: control de células de *P. pastoris* KM71 en agar RDB sin histidina.

### 7.3.3.7. Caracterización fenotípica de clonas de *P. pastoris* KM71 transformadas con pGAHbGalgs de la segunda construcción

Los resultados de la caracterización fenotípica de actividad de  $\beta$ -galactosidasa (**Figura 83**) indicaron que las células de *P. pastoris* KM71bGalgs provenientes de la segunda transformación no presentaron actividad de  $\beta$ -galactosidasa, debido a que no se

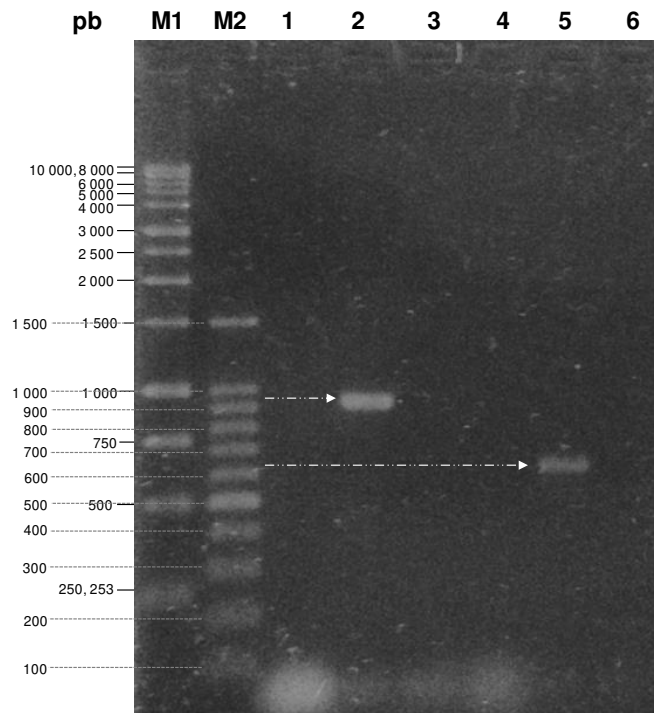
observó desarrollo de coloración azul en las colonias o a su alrededor, al contrario que las cepas control con actividad intracelular de  $\beta$ -galactosidasa, las cuales sí desarrollaron coloración azul.



**Figura 83.** Caracterización fenotípica de clonas de *P. pastoris* KM71bGalgs provenientes de la segunda transformación mediante cultivo en agar YPD con X-gal.

### 7.3.3.8. Caracterización por PCR de clonas de *P. pastoris* KM71 transformadas con pGAHbGalgs de la segunda construcción

La caracterización por PCR con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS (dirigidos al promotor GAH y a una secuencia interna de b-Galgs), y 5BGALGS y 3BGALGS (dirigidos a secuencias internas de b-Galgs) de clonas de *P. pastoris* KM71bGalgs transformada con pGAHbGalgs de la segunda construcción mostró los resultados esperados (bandas de 921 y 626 pb, respectivamente) para la reacción de PCR con el DNA genómico de la clona 1. Sin embargo, la reacción de PCR con el DNA genómico de la clona 2 no presentó producto amplificado (**Figura 84**), a pesar de haberse procesado de la misma forma que el de la clona 1, lo que indica que la colonia podría ser una colonia revertiente capaz de crecer en medio sin histidina o que el plásmido con el que se transformó presentó alguna alteración.

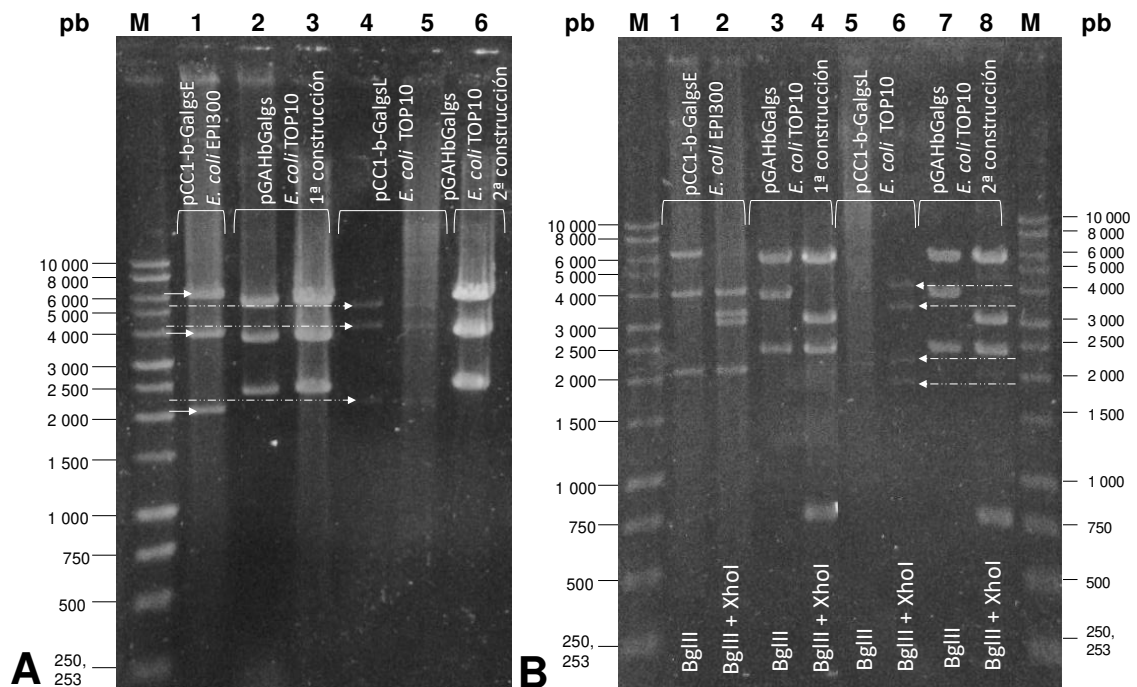


**Figura 84.** Caracterización por PCR a partir de DNA genómico de dos clonas de *P. pastoris* KM71bGalgs de la segunda transformación. Se emplearon los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS (carriles 1 a 3), y 5BBGALGS y 3BGALGS (carriles 4 a 6). La tinción del gel se realizó sumergiendo el gel en GelRed 3X por 30 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 70 min, agarosa 1.5 %. Carril M1: marcador 1 kb Ladder (Promega) (1  $\mu$ L). Carril M2: marcador 100 bp Ladder (Promega) (1  $\mu$ L). Carriles 1 y 4: control negativo de PCR (5  $\mu$ L). Carriles 2 y 5: PCR de clona 1 (1  $\mu$ L). Carriles 3 y 6: PCR de clona 2 (1  $\mu$ L).

#### 7.3.4. Caracterizaciones por análisis de restricción de los plásmidos pCC1-b-Galgs y pGAHbGalgs empleados o derivados de la primera y segunda construcciones

La electroforesis en gel de agarosa de la caracterización con la enzima de restricción BglII de los plásmidos pCC1-b-Galgs empleados en los dos primeros intentos de construcción del plásmido pGAHbGalgs (**Figura 85**, panel A), permitió comprobar que las muestras de plásmidos pCC1-b-GalgsE y pCC1-b-GalgsL no presentaron el mismo patrón de fragmentos resultantes de la caracterización con BglII. Las bandas del plásmido pCC1-b-GalgsE obtenido de las células de *E. coli* EPI300 se encontraban aproximadamente en 6400, 4000 y 2100 pb, mientras que las del plásmido pCC1-b-GalgsL obtenido de *E. coli* TOP10 (usado en la segunda construcción de pGAHbGalgs) presentaron un tamaño aproximado de 5500, 4000 y 2100 pb, estas últimas

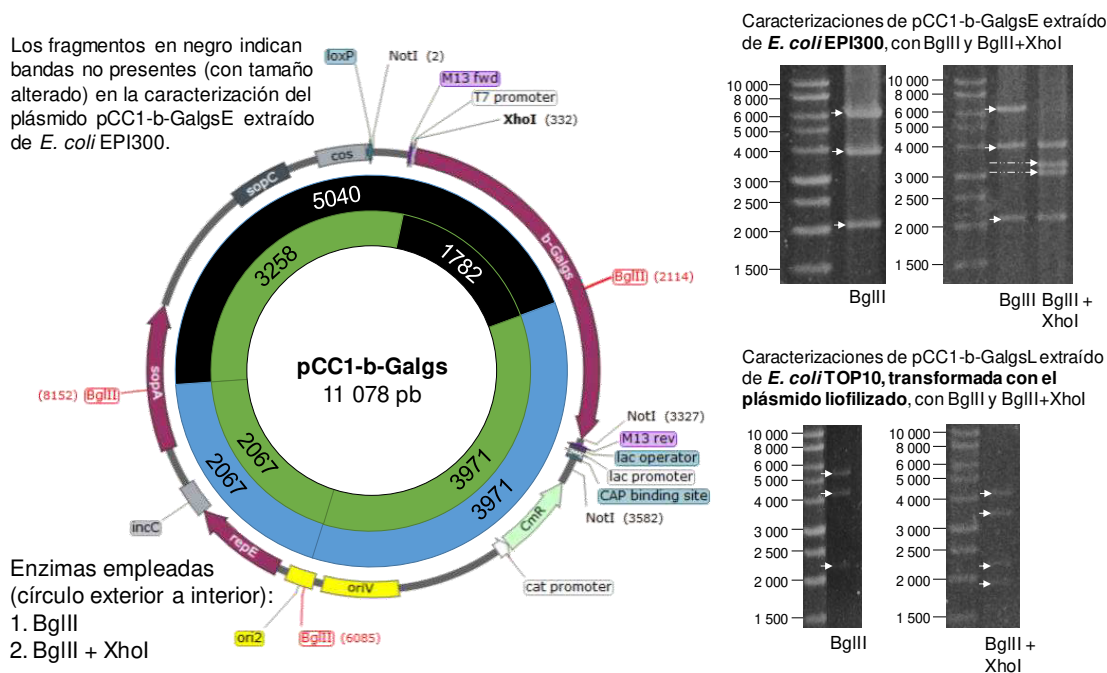
con un tamaño más cercano al teórico de 5040, 3971 y 2067 pb. Las diferencias entre ambos plásmidos fueron más notorias en la caracterización por doble digestión con BglII y XhoI (**Figura 85**, panel B), en la cual permanecieron las bandas de 4000 y 2100 pb de la caracterización con BglII del plásmido pCC1-b-GalgsE, mientras que el fragmento de ~6000 pb se escindió en dos de ~3000 y ~3300 pb, contrastando con los tamaños teóricos de 3258 y 1782 pb. La caracterización con BglII y XhoI del plásmido pCC1-b-GalgsL generó fragmentos de 4200, 3500, 2200 y 1900 pb, ligeramente mayores a los tamaños teóricos de 3971, 3258, 2067 y 1782 pb, por lo cual es posible que los fragmentos se observaran de ese tamaño por efecto de la electroforesis, como lo evidencian algunas bandas de los marcadores de tamaño.



**Figura 85.** Caracterización mediante análisis de restricción de los plásmidos pCC1-b-Galgs y pGAHbGalgs empleados en las dos primeras construcciones. La tinción de los geles se realizó sumergiendo el gel en GelRed 3X por 30 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 60 (A) u 80 (B) min, agarosa 0.8 %. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Las flechas se presentan como apoyo visual para determinar el tamaño de las bandas. A) Caracterización con la enzima BglII de los plásmidos mencionadas a continuación: Carril 1: pCC1-b-GalgsE de EPI300 a 24 °C, midiprep (8  $\mu$ L). Carril 2: pGAHbGalgs de la primera construcción, midiprep 4 (8  $\mu$ L). Carril 3: pGAHbGalgs de la primera construcción, midiprep kit (8  $\mu$ L). Carril 4: pCC1-b-Galgs de *E. coli* TOP10 transformada con plásmido liofilizado, colonia 1 miniprep kit (8  $\mu$ L). Carril 5: pCC1-b-GalgsL de *E. coli* TOP10 transformada con plásmido liofilizado, midiprep 2b (8  $\mu$ L). Carril 6: pGAHbGalgs de la segunda construcción, miniprep kit (8  $\mu$ L). B) Caracterización con BglII (carriles 1, 3, 5 y 7) y BglII + XhoI (carriles 2, 4, 6 y 8). Se indica el origen de la muestra sobre los carriles, así como las enzimas de restricción empleadas en la parte inferior.



El patrón de bandas distinto al teórico que presentó el plásmido extraído de la cepa de *E. coli* EPI300 volvió a confirmar que el plásmido pCC1-b-GalgsE se encontraba alterado. La comparación de los patrones de restricción observados del plásmido pCC1-b-Galgs contra los teóricos se muestra en la **Figura 86**.

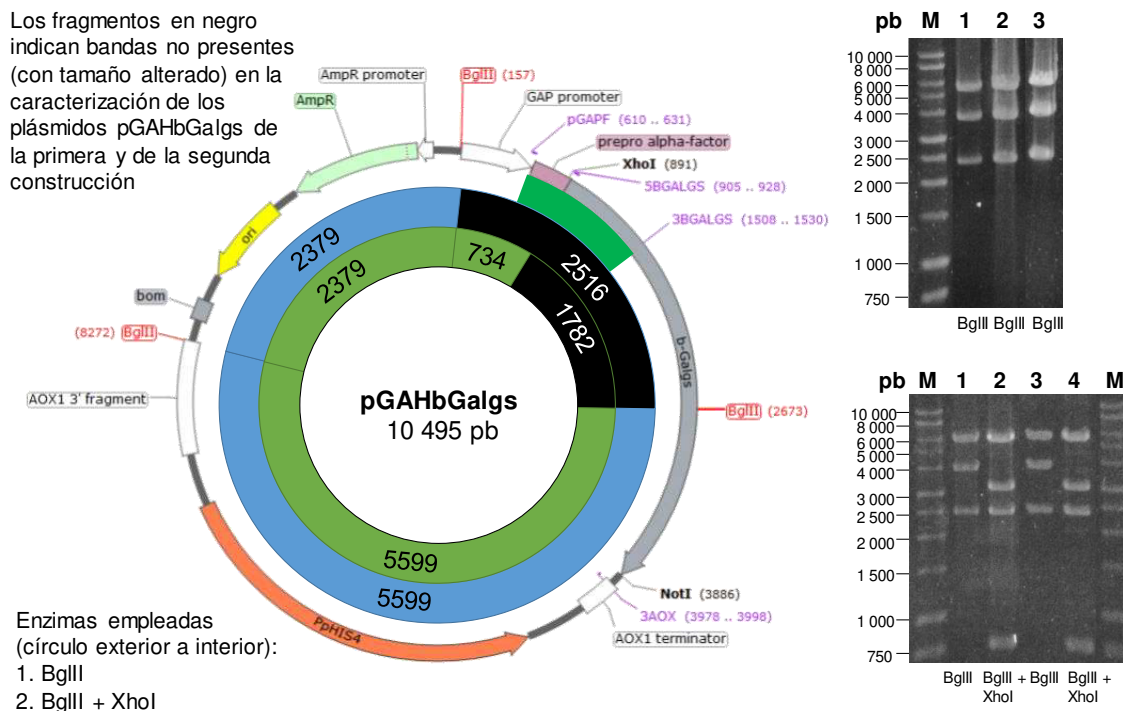


**Figura 86.** Caracterizaciones de pCC1-b-Galgs mediante análisis de restricción con BglII y BglII + XhoI. Los números indican el tamaño teórico del fragmento en pb. Los fragmentos del mapa de restricción resaltados en negro indican bandas no encontradas en la electroforesis de la caracterización del plásmido pCC1-b-Galgs proveniente de *E. coli* EPI300 pCC1-b-Galgs. Se muestran fragmentos de la **Figura 85** editados para eliminar carriles entre la caracterización de interés y el marcador de tamaño molecular.

En los análisis por electroforesis de la caracterización con BglII, los plásmidos pGAHbGalgs provenientes tanto de la primera como de la segunda construcción presentaron un patrón de bandas de aproximadamente 5600, 3800 y 2400 pb (**Figura 85**, panel A), mientras que el patrón teórico posee fragmentos de 5599, 2516 y 2379 pb. Las bandas observadas de mayor y menor tamaño coinciden con las del tamaño teórico, sin embargo, la banda de ~3800 pb presentó cerca de 1300 pb de diferencia con los 2516 pb teóricos. La caracterización con BglII y XhoI de los plásmidos pGAHbGalgs mantuvo las bandas de 5600 y 2400 observadas en la digestión con BglII, mientras que el fragmento de ~3800 pb se escindió en dos fragmentos de ~3000 y ~750 pb (**Figura 85**, panel B). Los tamaños esperados en la caracterización con BglII y XhoI eran de 5599, 2379, 1782, 734. Los fragmentos teóricos de 5599, 2379 y 734 pb coinciden con los observados de



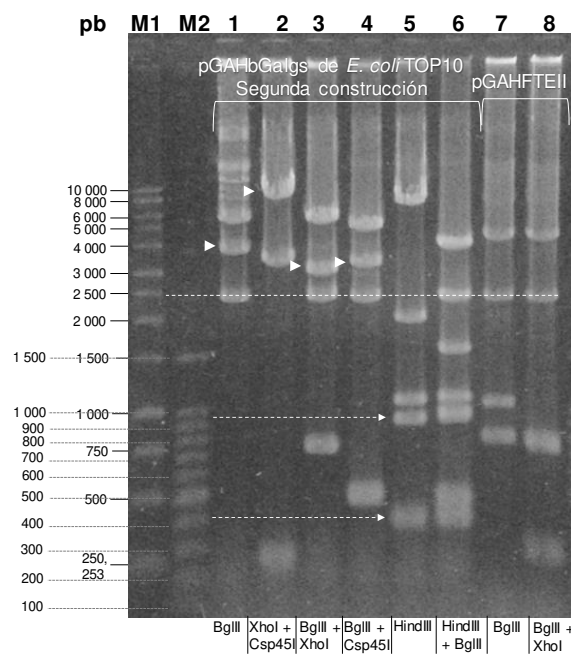
aproximadamente 5600, 2400 y 750 pb, sin embargo, el fragmento restante observado de 3000 pb difiere por cerca de 1200 pb del fragmento teórico de 1782 pb. La comparación de los patrones de restricción del plásmido pGAHbGalgs mostrados en la **Figura 85** contra los patrones teóricos se muestra en la **Figura 87**.



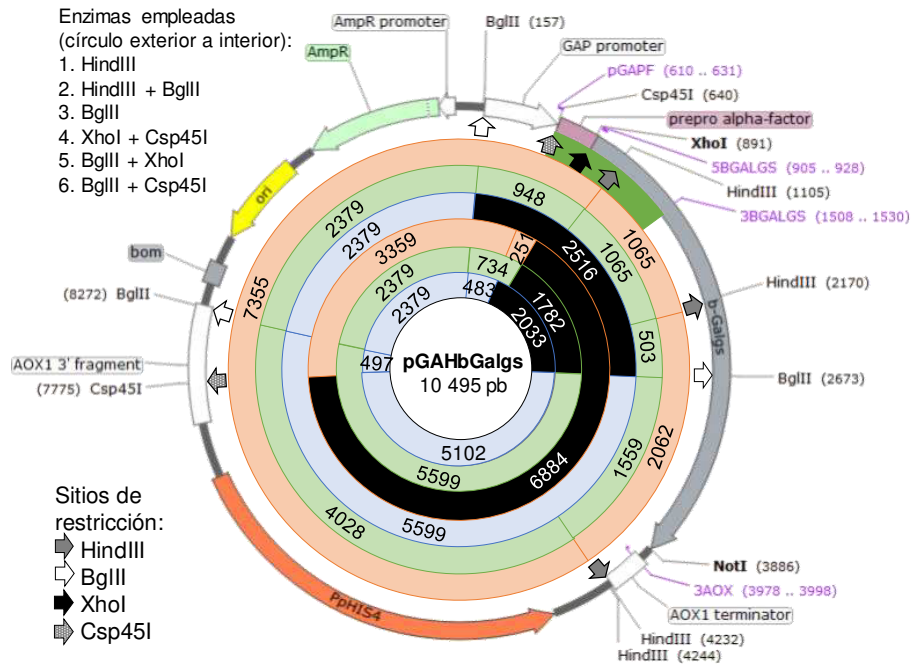
**Figura 87.** Caracterizaciones de pGAHbGalgs mediante análisis de restricción con BglII y BglII + XhoI. Los números indican el tamaño teórico del fragmento en pb. Los fragmentos del mapa de restricción resaltados en negro indican bandas que no se encontraron en las caracterizaciones del plásmido pGAHbGalgs de las primeras dos construcciones. Se muestran fragmentos de la **Figura 85** editados para eliminar carriles entre la caracterización de interés y el marcador de tamaño molecular. La zona resaltada en verde entre el mapa del plásmido y los mapas de restricción indica la zona del plásmido amplificada por los oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS, ya caracterizada.

El análisis mediante electroforesis en gel de agarosa con post-tinción del resto de las caracterizaciones por enzimas de restricción de los plásmidos pGAHbGalgs de la segunda construcción y de pGAHFTEII (**Figura 88**) mostró bandas que no concordaban con el tamaño teórico (carriles 1 a 4) o bandas adicionales (carriles 5 y 6) en las caracterizaciones de pGAHbGalgs. Para una mejor visualización de las bandas no concordantes, se realizó un esquema con los mapas de restricción teóricos de pGAHbGalgs con las enzimas utilizadas, resaltando con negro las bandas observadas con tamaño distinto al tamaño teórico (**Figura 89**). Todas las bandas que presentaban un

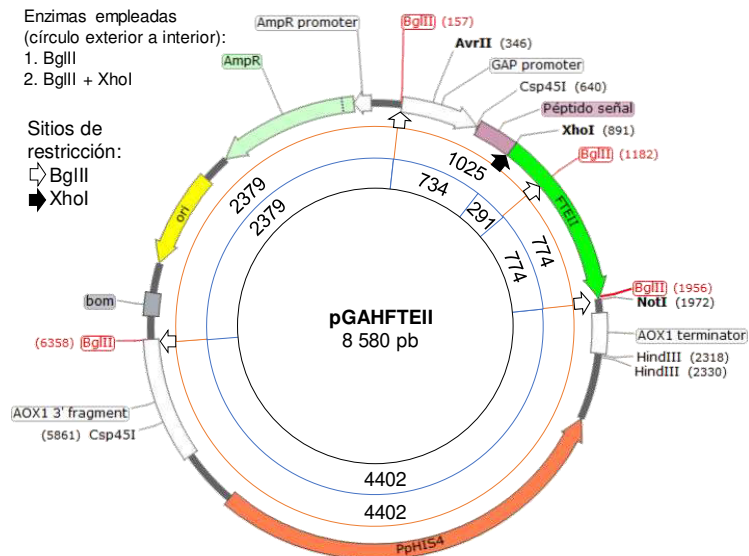
tamaño diferente al teórico se ubicaban en la misma zona del plásmido, sobre el inserto b-Galgs. Las caracterizaciones en las que se encontraron las bandas adicionales, que fueron las realizadas con la enzima HindIII, mostraron todas las bandas esperadas con los tamaños teóricos correctos (7355, 2062 y 1065 pb para HindIII, y 4028, 2379, 1559, 1065, 948 y 503 pb para HindIII + BglII), sin embargo, también presentaron dos bandas no esperadas de tamaños de ~900 y ~400 pb (resaltadas con flechas en la **Figura 88**). El análisis de restricción con BglII y BglII y XhoI de pGAHFTEII (carriles 7 y 8 de la **Figura 88**) mostró las bandas del tamaño teórico esperado (5599, 2516 y 2379 pb para BglII, y 5599, 2379, 1782 y 734 pb para BglII + XhoI) (**Figura 90**), sin presentar bandas adicionales, confirmando que la secuencia del vector pGAH no se encontraba alterada. También permitió comparar la banda común de 2379 pb presente en las caracterizaciones con BglII de pGAHbGalgs y pGAHFTEII (línea punteada en la **Figura 88**).



**Figura 88.** Caracterizaciones mediante análisis de restricción de los plásmidos pGAHbGalgs de la segunda construcción y de pGAHFTEII. Se indica el origen de la muestra sobre los carriles, así como las enzimas de restricción empleadas en la parte inferior. Se depositaron 5  $\mu$ L de cada caracterización en el gel. La tinción del gel se realizó sumergiendo el gel en GelRed 3X por 30 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 80 min, agarosa 0.8 %. Carril M1: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carril M2: marcador 100 bp Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carriles 1 a 6: caracterizaciones mediante análisis de restricción del plásmido pGAHbGalgs con las enzimas 1) BglII, 2) XhoI + Csp45I, 3) BglII + XhoI, 4) BglII + Csp45I, 5) HindIII, 6) HindIII + BglII, en ese orden. Carriles 7 y 8: caracterizaciones mediante análisis de restricción del plásmido pGAHFTEII con las enzimas 1) BglII, 2) BglII + XhoI, en ese orden. La línea punteada indica la posición de la banda común a las caracterizaciones con BglII, las cabezas de flecha indican las bandas cuyo tamaño observado no concordó con el teórico, las flechas indican las bandas adicionales que se presentaron en las caracterizaciones con HindIII.



**Figura 89.** Caracterizaciones de pGAHbGalgs mediante análisis de restricción con HindIII, BglII, XhoI y Csp45I. Se incluyen los tamaños teóricos de las restricciones presentadas en la **Figura 88**. Las flechas indican sitios de restricción. Los números indican el tamaño teórico del fragmento en pb. Los fragmentos resaltados en negro indican que el tamaño teórico del fragmento no coincidió con el observado en la electroforesis. La zona verde resaltada entre el mapa del plásmido y los mapas de restricción indica la zona del plásmido amplificada por los oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS (ya caracterizada).

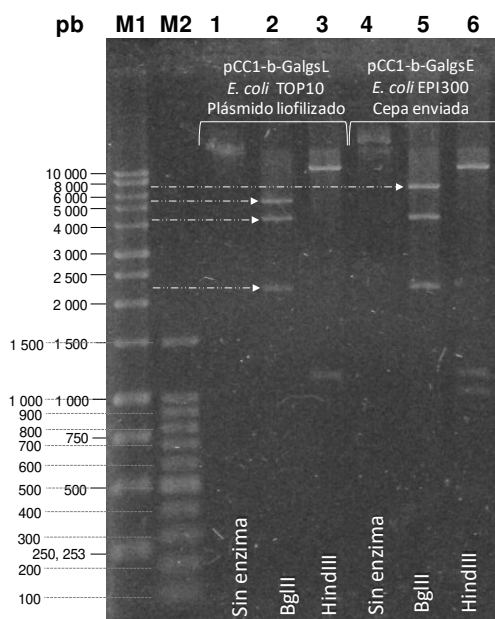


**Figura 90.** Caracterizaciones de pGAHFTEII mediante análisis de restricción con BglII y BglII + XhoI. Se incluyen los tamaños teóricos de las restricciones presentadas en la **Figura 88**. Las flechas indican sitios de restricción. Los números indican el tamaño teórico del fragmento en pb. El círculo más cercano al mapa del plásmido corresponde al mapa de restricción teórico de pGAHFTEII con BglII, el círculo interior corresponde al mapa de restricción teórico de pGAHFTEII con BglII y XhoI.

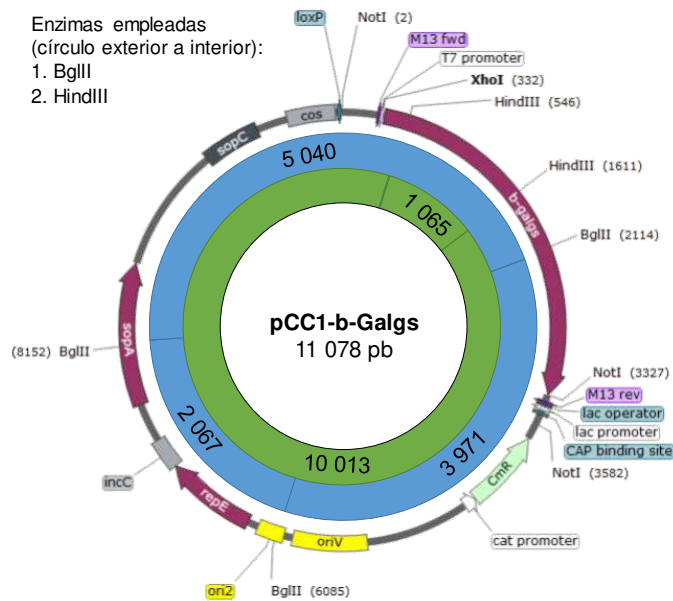
### 7.3.5. Tercera construcción del plásmido pGAHbGalgs

#### 7.3.5.1. Caracterización con HindIII de pCC1-b-GalgsL

Las caracterizaciones con las enzimas de restricción BglII y HindIII del plásmido pCC1-b-Galgs, extraído de cultivos incubados a temperatura ambiente de *E. coli* TOP10 transformada con el plásmido liofilizado pCC1-b-GalgsL (colonia N4) y de *E. coli* EPI300, mostraron diferencias en los patrones de bandas de ambos plásmidos (**Figura 91**). En la caracterización con BglII, el plásmido pCC1-b-GalgsL de la cepa TOP10 presentó la banda con mayor tamaño en ~5000 pb, en el caso de la cepa EPI300, se encontró entre 7000 y 8000 pb. En la caracterización con HindIII, es evidente la presencia de una banda extra de entre 900 y 1000 pb en la caracterización del plásmido de EPI300, lo cual contradice el resultado teórico de únicamente dos bandas de 10013 y 1065 pb; la del plásmido extraído de *E. coli* TOP10 transformada con el plásmido liofilizado y cultivada a temperatura ambiente concordó con el patrón esperado (**Figura 92**). Por lo tanto, a partir de la colonia N4 se obtuvo el inserto empleado en la tercera construcción.

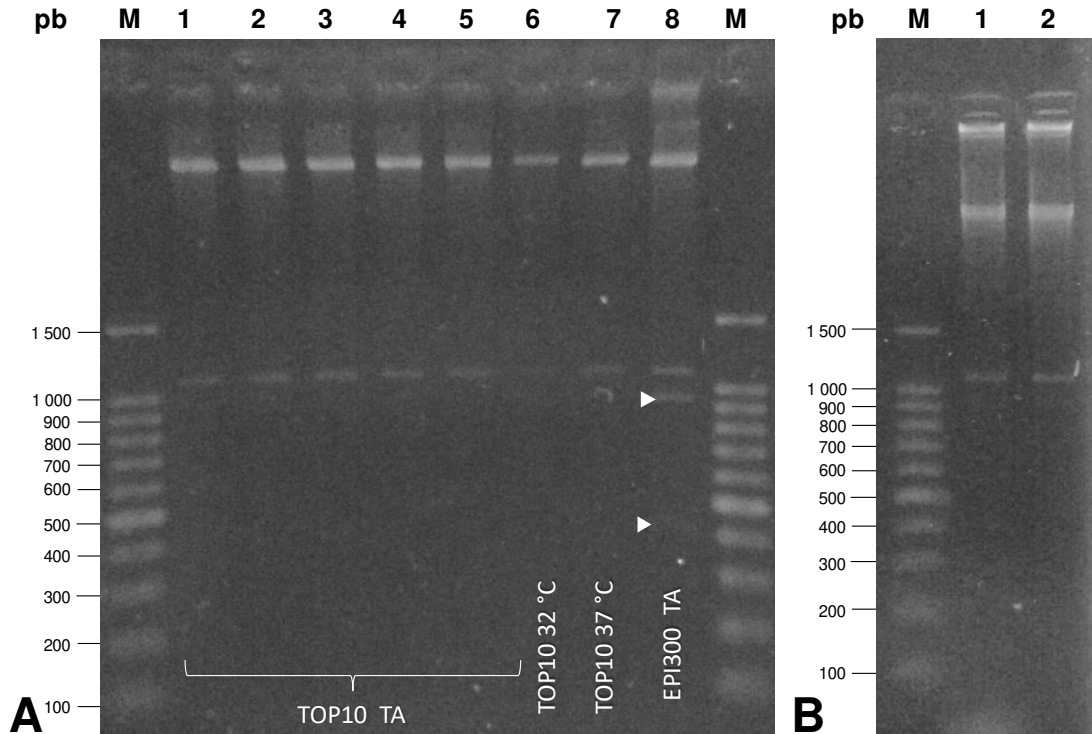


**Figura 91.** Electroforesis de digestiones del plásmido pCC1-b-Galgs obtenido de distintas fuentes con las enzimas de restricción BglII y HindIII. La tinción del gel se realizó sumergiendo el gel en GelRed 3X por 30 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 85 min, agarosa 0.8 %. Carril M1: marcador 1 kb Ladder (Promega). Carril M2: marcador 100 bp Ladder (Promega). Carriles 1 a 3: caracterizaciones de pCC1-b-Galgs extraído de *E. coli* TOP10 transformada con el plásmido liofilizado (colonia N4). Carril 1: sin enzima (4  $\mu$ L). Carril 2: digestión con BglII (8  $\mu$ L). Carril 3: digestión con HindIII (8  $\mu$ L). Carriles 4 a 6: caracterizaciones de pCC1-b-Galgs extraído de *E. coli* EPI300. Carril 4: sin enzima (4  $\mu$ L). Carril 5: digestión con BglII (8  $\mu$ L). Carril 6: digestión con HindIII (8  $\mu$ L).



**Figura 92.** Caracterizaciones de pCC1-b-Galgs mediante análisis de restricción con BglII y HindIII. Los números indican el tamaño teórico del fragmento en pb.

El análisis de restricción con la enzima HindIII del plásmido pCC1-b-GalgsL de la colonia N4 de *E. coli* TOP10 cultivada a temperatura ambiente, a 32 °C y a 37 °C, de los plásmidos pCC1-b-GalgsL de las colonias 1 a 3 de *E. coli* TOP10 cultivadas a temperatura ambiente y del plásmido pCC1-b-GalgsE de *E. coli* EPI300, mostró el patrón de bandas esperado en todos los plásmidos analizados, excepto en el proveniente de la cepa EPI300, en donde se observaron dos banda extra de 900-1000 y 400-500 pb, confirmando nuevamente la alteración del plásmido en esta cepa (**Figura 93**, panel A). Se concluyó que la temperatura de cultivo después de la transformación no ocasiona la modificación del plásmido pCC1-b-GalgsL propagado en *E. coli* TOP10. Sin embargo, no es posible aseverar que la temperatura de cultivo no modifique al plásmido de la construcción final (pGAHbGalgs), como lo evidencian los resultados de la segunda construcción mencionados en apartados anteriores, y de los resultados de la tercera construcción que se describirán posteriormente. La caracterización con la enzima de restricción HindIII de dos midipreps del plásmido pCC1-b-GalgsL proveniente de la colonia N4 coincidió con el resultado teórico, al presentar dos bandas de aproximadamente 10013 y 1065 pb, sin presentar bandas adicionales (**Figura 93**, panel B). Por lo tanto, se asumió que la secuencia del plásmido no se encontraba alterada y se procedió a su empleo para obtener el inserto b-Galgs.

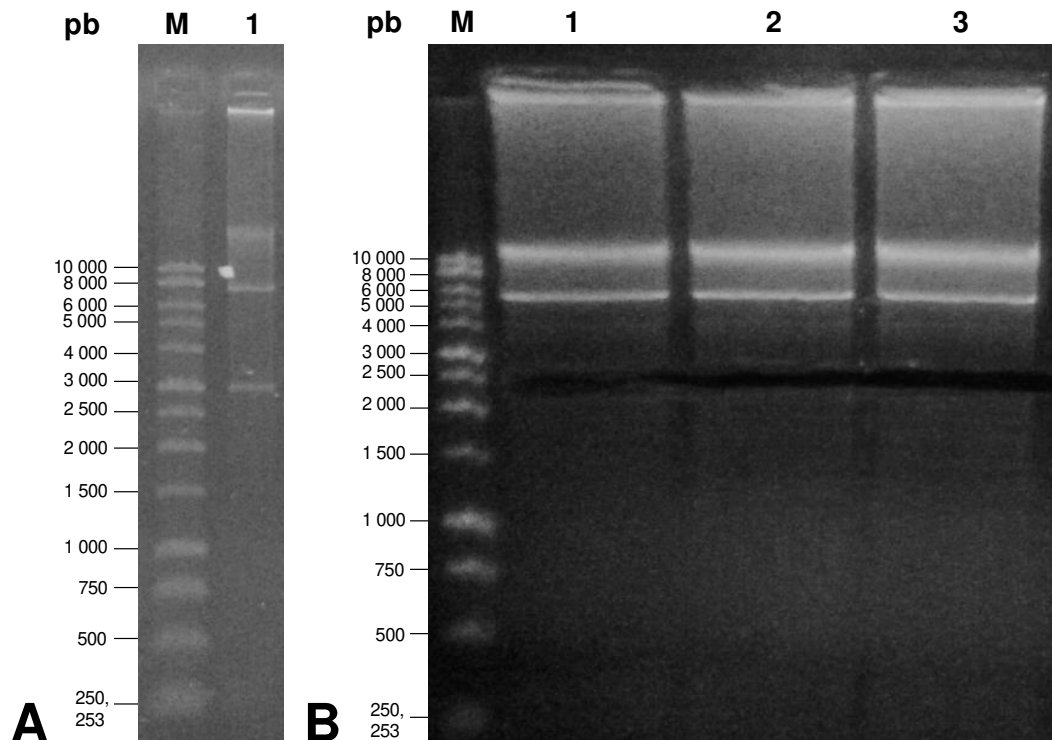


**Figura 93.** Caracterización mediante análisis de restricción con HindIII de plásmidos pCC1-b-Galgs obtenidos de diferentes cepas y a diferentes temperaturas de cultivo. La tinción de los geles se realizó sumergiendo el gel en GelRed 3X por 30 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 85 (A) o 60 (B) min, agarosa 1.5 %. Carril M: marcador 100 bp Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). A) Caracterización de plásmidos pCC1-b-Galgs a diferentes temperaturas de cultivo. Los plásmidos se obtuvieron de clonas de *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido liofilizado y de *E. coli* EPI300 pCC1-b-Galgs. Se indica la cepa de *E. coli* de procedencia del plásmido y su temperatura de cultivo (temperatura ambiente [TA] a menos que se indique lo contrario). Se cargaron 10  $\mu$ L de cada caracterización. Carril 1: colonia 1. Carril 2: colonia 1, recultivada. Carril 3: colonia 2. Carril 4: colonia 3. Carril 5: colonia N4. Carril 6: colonia N4, recultivada a 32  $^{\circ}$ C. Carril 7: colonia N4, recultivada a 37  $^{\circ}$ C. Carril 8: *E. coli* EPI300 (*bac-stab*), recultivada. B) Caracterización por análisis de restricción con HindIII de plásmidos pCC1-b-Galgs obtenidos de *E. coli* TOP10 pCC1-b-Galgs (colonia N4). Carril 1: digestión de pCC1-b-Galgs de midiprep 1 de la colonia N4 (8  $\mu$ L). Carril 2: digestión de pCC1-b-Galgs de midiprep 2 de la colonia N4 (8  $\mu$ L).

### 7.3.5.2. Purificación de bandas de inserto y ligación del inserto b-Galgs con el vector pGAH de la tercera construcción

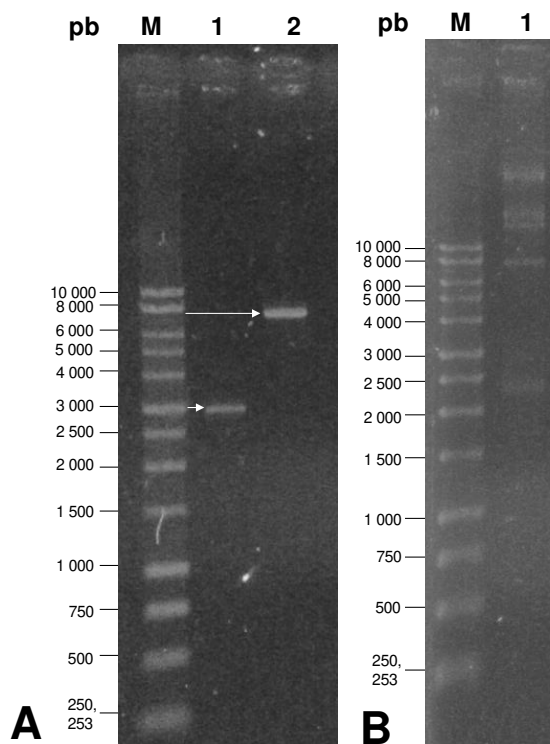
La electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % con post-tinción de la reacción de restricción a escala preparativa de pCC1-b-GalgsL con XhoI y NotI (6.4.7.3) (Figura 94, panel A) mostró una digestión parcial del plásmido al no cortarse todo el vector. A pesar de lo anterior, el resultado teórico de la digestión, dos bandas visibles de 7498 y 2995 pb y dos de 330 y 255 pb que pueden no observarse, coincidió con lo observado al encontrarse en el gel las bandas esperadas de aproximadamente 7498 y 2995 pb. Por lo tanto, se concluyó que el inserto b-Galgs presentó el tamaño correcto de 2995 pb y se procedió con

la purificación de la banda del inserto. En la electroforesis, tratada para disminuir la actividad de nucleasas, para purificar la banda del inserto b-Galgs (**Figura 94**, panel B) se esperaba el mismo resultado del análisis de la digestión preparativa de pCC1-b-GalgsL con XhoI y NotI, sin embargo, las bandas podían no mostrarse en el tamaño esperado debido a la pre-tinción del gel, que puede afectar la migración de algunas muestras en la electroforesis. Como resultado, se observaron bandas de tamaños ~5500 y ~2500 pb, menores a los esperados. Sin embargo, como en la electroforesis de prueba con post-tinción se verificó el tamaño correcto, se procedió a purificar la banda correspondiente al inserto.



**Figura 94.** Reacción de restricción preparativa de pCC1-b-GalgsL con XhoI y NotI. A) Verificación de la reacción de restricción preparativa de pCC1-b-GalgsL con XhoI y NotI. La tinción del gel se realizó sumergiendo el gel en GelRed 3X por 30 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 70 min, agarosa 0.8 %. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carril 1: digestión preparativa de pCC1-b-Galgs con XhoI y NotI (2  $\mu$ L). B) Purificación de inserto b-Galgs a partir de digestión preparativa de pCC1-b-GalgsL con XhoI y NotI. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 60 min, agarosa 0.8 %. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carriles 1 a 3: digestión preparativa de pCC1-b-GalgsL con XhoI y NotI (98  $\mu$ L distribuidos entre los tres carriles).

En la electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % con post-tinción empleada para verificar la integridad y el tamaño del inserto b-Galgs purificado y del vector pGAH almacenado (6.4.4.5) (Figura 95, panel A) que se usarían en la ligación para la tercera construcción del plásmido pGAHbGalgs, se esperaban bandas definidas de 2995 pb en el caso del inserto b-Galgs y 7499 pb en el caso del vector pGAH, lo cual coincidió con lo observado en la electroforesis. Los fragmentos analizados se utilizaron para la ligación, que posteriormente se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % con post-tinción para verificar que se hubiera llevado a cabo (Figura 95, panel B). Se esperaba la desaparición de las bandas de inserto y vector y/o la formación de varias bandas extra. Como resultado, se formaron 3 bandas extra de tamaño superior a 10000 pb que podían corresponder al plásmido ligado, una banda de ~7500 pb que podía deberse a restos del vector, y una banda de aproximadamente 2300 pb. Se concluyó que hubo ligación de los fragmentos, y se continuó con su uso para la transformación de *E. coli*.

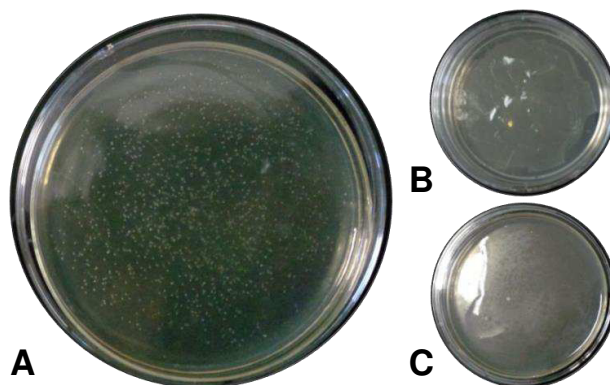


**Figura 95.** Controles del proceso de ligación de la tercera construcción. La tinción de los geles se realizó sumergiendo el gel en GelRed 3X por 30 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 40 (A) o 70 (B) min, agarosa 0.8 %. Carril M: marcador 1 kb Ladder (Promega). A) Análisis de inserto b-Galgs y vector pGAH utilizados para la ligación en la tercera construcción. Carril 1: inserto b-Galgs (3  $\mu$ L). Carril 2: vector pGAH (1  $\mu$ L). B) Análisis de la ligación utilizada para la transformación en la tercera construcción. Carril 1: reacción de ligación (6  $\mu$ L).



### 7.3.5.3. Transformación de *E. coli* TOP10 calciocompetente con la tercera construcción de pGAHbGalgs

Como resultado de la transformación de *E. coli* TOP10 con el plásmido pGAHbGalgs de la ligación de la tercera construcción, se obtuvieron más de 1000 colonias en la placa de las células transformadas (**Figura 96**). Se presentó crecimiento en el control de viabilidad, y no crecieron colonias en el control de susceptibilidad a ampicilina.



**Figura 96.** Transformación con la ligación de la tercera construcción de pGAHbGalgs. A) Transformación con ligación de la tercera construcción. B) Control de viabilidad. C) Control de susceptibilidad a ampicilina.

### 7.3.5.4. Caracterización por análisis de restricción de los plásmidos extraídos de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con la ligación pGAHbGalgs de la tercera construcción (I)

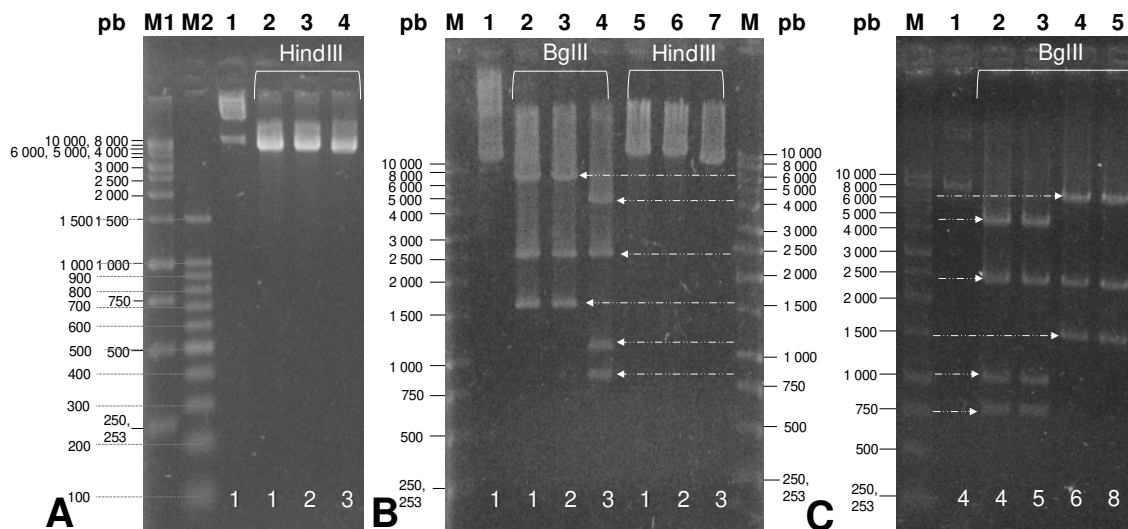
Las extracciones de DNA plasmídico de 4 mL de los cultivos de colonias 1, 2 y 3 se cuantificaron (**Tabla 98**) para posteriormente caracterizarse con enzimas de restricción, con el fin de demostrar la correcta construcción del plásmido pGAHbGalgs en las colonias transformadas.

**Tabla 98.** Cuantificación de plásmidos extraídos de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con la ligación pGAHbGalgs de la tercera construcción.

Colonia origen del plásmido	Concentración (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Kit de extracción*
1	53	1.783	0.914	W
2	38	1.652	1.267	W
3	48	1.1882	1.055	W
4	475	2.154	2.575	PY
5	359	2.137	2.620	PY
6	280	2.105	2.605	PY
8	250	2.088	2.625	PY

\*W: Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), PY: PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega).

En el análisis de restricción con la enzima HindIII de tres de los plásmidos extraídos se esperaba como resultado que las muestras presentaran tres bandas visibles de 7355, 2062 y 1065 pb en caso de ser el pGAHbGalgs correcto, sin presentar las bandas de ~900 y ~450 pb que aparecían en análisis de construcciones anteriores. Los resultados obtenidos no coincidieron con el resultado teórico ni con ningún resultado previo de caracterización con dicha enzima, ya que se observó únicamente la linealización de los plásmidos de las tres colonias analizadas (**Figura 97**, panel A), indicando que los plásmidos analizados contenían solo un sitio de restricción para HindIII. El único plásmido con el que se trabajó que presentaba dicha característica era pGAHFTEII, del cual se obtuvo el vector pGAH. Por lo tanto, posibles causas de este resultado serían contaminación con pGAHFTEII, alteración del plásmido pGAHbGalgs o inhibición de la restricción con HindIII, esta última menos probable porque la reacción de restricción fue distinta al plásmido sin cortar.



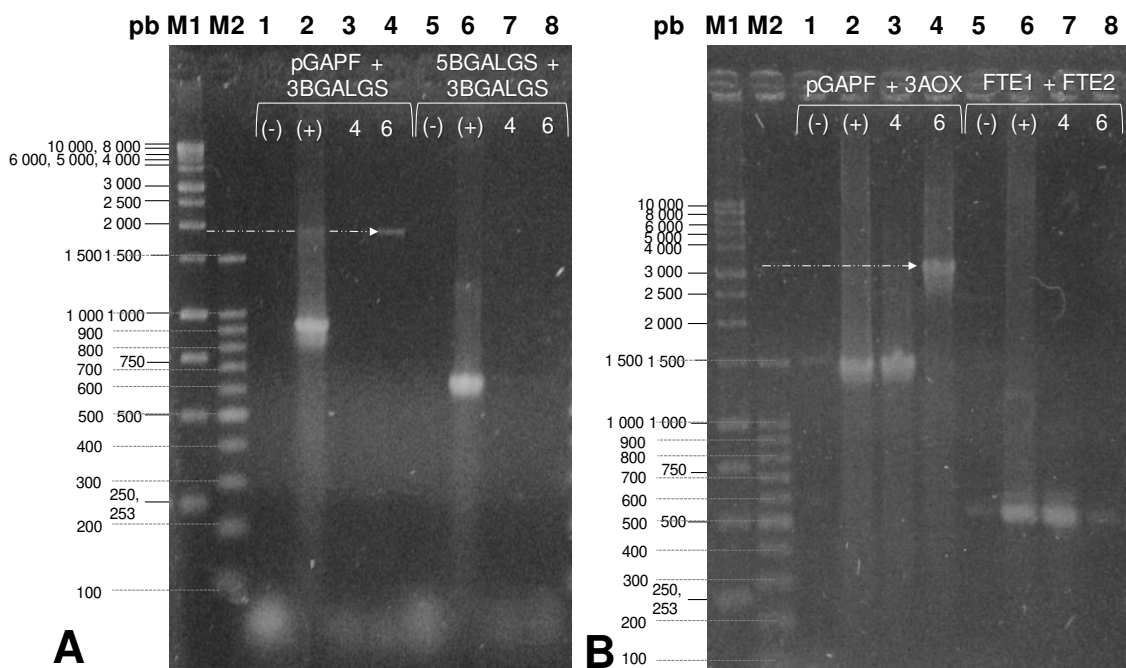
**Figura 97.** Caracterización mediante análisis de restricción de los plásmidos extraídos de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con la ligación pGAHbGalgs de la tercera construcción. Se indican las enzimas de restricción usadas en los carriles correspondientes. Se agregaron flechas para apoyar la determinación del tamaño de la banda. Se indica el número de la colonia correspondiente a la muestra de DNA plasmídico empleada en la parte inferior de los gels. La tinción de los gels se realizó sumergiendo el gel en GelRed 3X por al menos 30 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 70 min, agarosa 1.5 % (A) o 0.8 % (B y C). Carriles M1 o M: marcador 1kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carril M2: marcador 100 bp Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). A) Caracterización con HindIII. Carril 1: miniprep de plásmido extraído de colonia 1 sin enzima de restricción (5  $\mu$ L). Carriles 2 a 4: digestiones de los plásmidos extraídos de las colonias 1, 2 y 3, respectivamente, con HindIII (10  $\mu$ L). B) Caracterización con BglIII y HindIII. Carril 1: miniprep de plásmido extraído de colonia 1 sin enzima de restricción (5  $\mu$ L). Carriles 2 a 4: digestiones de los plásmidos extraídos de las colonias 1, 2 y 3, respectivamente, con BglIII (10  $\mu$ L). Carriles 5 a 7: digestiones de los plásmidos extraídos de las colonias 1, 2 y 3, respectivamente, con HindIII (7  $\mu$ L). C) Caracterización con BglIII. Carril 1: miniprep de plásmido extraído de colonia 4 sin enzima de restricción (0.5  $\mu$ L). Carriles 2 a 5: digestiones de los plásmidos extraídos de las colonias 4, 5, 6 y 8, respectivamente, con BglIII (4  $\mu$ L).

La caracterización de los plásmidos con la enzima de restricción BglIII, realizada para descartar fallas en la reacción en el análisis con HindIII, teóricamente debía generar fragmentos de 5599, 2516 y 2379 pb para el plásmido pGAHbGalgs correcto, de 5040, 3971 y 2067 pb para el plásmido pCC1-b-Galgs y de 4402, 2379, 1025 y 774 pb para el plásmido pGAHFTEII. Se observaron 2 patrones de restricción distintos en las 3 colonias analizadas. Las colonias 1 y 2 presentaron 3 bandas de aproximadamente 6500, 2400 y 1550 pb, y la colonia 3 presentó 4 bandas de aproximadamente 4500, 2400, 1100 y 800 pb (**Figura 97**, panel B). Las posibles causas de la diferencia pudieron ser una alteración del plásmido pGAHbGalgs o contaminación con un plásmido desconocido en las colonias 1 y 2, y una contaminación con pGAHFTEII en la colonia 3, ya que el patrón de restricción coincidió con el de ese plásmido. Se debe mencionar que los dos patrones de bandas obtenidos compartieron la presencia de una banda de ~2400 pb, por lo cual es posible que el plásmido de las colonias 1 y 2 derive del vector pGAH. El análisis con BglIII de los plásmidos extraídos de las colonias 4, 5, 6 y 8, mostró los dos patrones de bandas ya observados en el análisis de las colonias 1,2 y 3. Los patrones de las colonias 4 y 5 fueron iguales al de la colonia 3 (plásmido pGAHFTEII), y los de las colonias 6 y 8 fueron iguales al de las colonias 1 y 2 (**Figura 97**, panel C).

#### **7.3.5.5. Caracterización por PCR de *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido pGAHbGalgs de la tercera construcción**

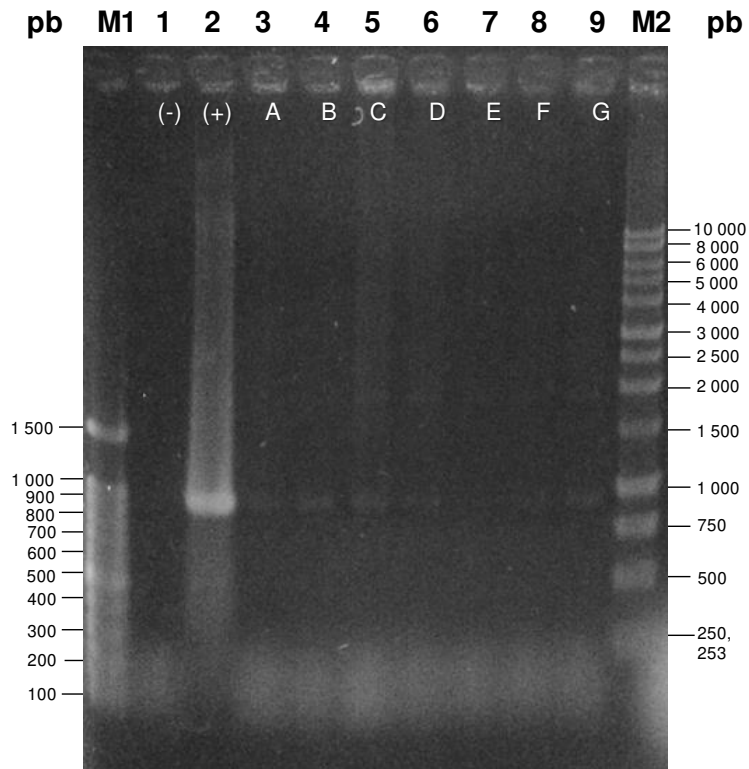
El análisis por electroforesis de los ensayos de PCR para la caracterización de los plásmidos provenientes de las colonias 4 y 6 (**Figura 98**) confirmó que el plásmido proveniente de la colonia 4 era pGAHFTEII, ya que no amplificó con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS, y 5BGALGS y 3BGALGS, mientras que en las reacciones con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3AOX, o FTE1 y FTE2 se obtuvo el mismo tamaño de la banda amplificada que el control positivo pGAHFTEII. En cuanto a la colonia 6, presentó una banda de tamaño superior a 3000 pb, semejante al esperado (3389 pb) en la reacción de PCR con pGAHbGalgs y el par de oligonucleótidos pGAPF y 3AOX. Sin embargo, presentó un tamaño de banda distinto al esperado con el par de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS, ya que el tamaño teórico era 921 pb mientras que el observado resultó en cerca de 2000 pb. Además, el plásmido de la colonia 6 no presentó amplificación con el par de oligonucleótidos 5BGALGS y 3BGALGS. Esto indica que el

plásmido analizado posee un inserto de tamaño similar al b-Galgs, pero que tiene los sitios de unión a los oligonucleótidos específicos para b-Galgs alterados en su secuencia.



**Figura 98.** PCR para caracterización de plásmidos resultantes del tercer intento de construcción de pGAHbGalgs. En la parte superior de los carriles se indica el par de oligonucleótidos empleado en la reacción, así como las muestras empleadas para los ensayos. (-): control negativo de PCR (5  $\mu$ L), (+): control positivo (pGAHbGalgs de la segunda construcción para el gel A y pGAHFTEII para el gel B) (2  $\mu$ L), 4: plásmido de la colonia 4 de la tercera construcción (2  $\mu$ L), 6: plásmido de la colonia 6 de la tercera construcción (2  $\mu$ L). La tinción de los geles se realizó sumergiéndolos en GelRed 3X por 60 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 80 min, agarosa 1.5 % (A) o 0.8 % (B). Carriles M1: marcador 1 kb Ladder (Promega). Carriles M2: marcador 100 bp Ladder (Promega). A) Electroforesis de PCR con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS (carriles 1 a 4), y 5BGALGS y 3BGALGS (carriles 5 a 8). B) Electroforesis de PCR con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3AOX (carriles 1 a 4), y FTE1 y FTE2 (carriles 5 a 8).

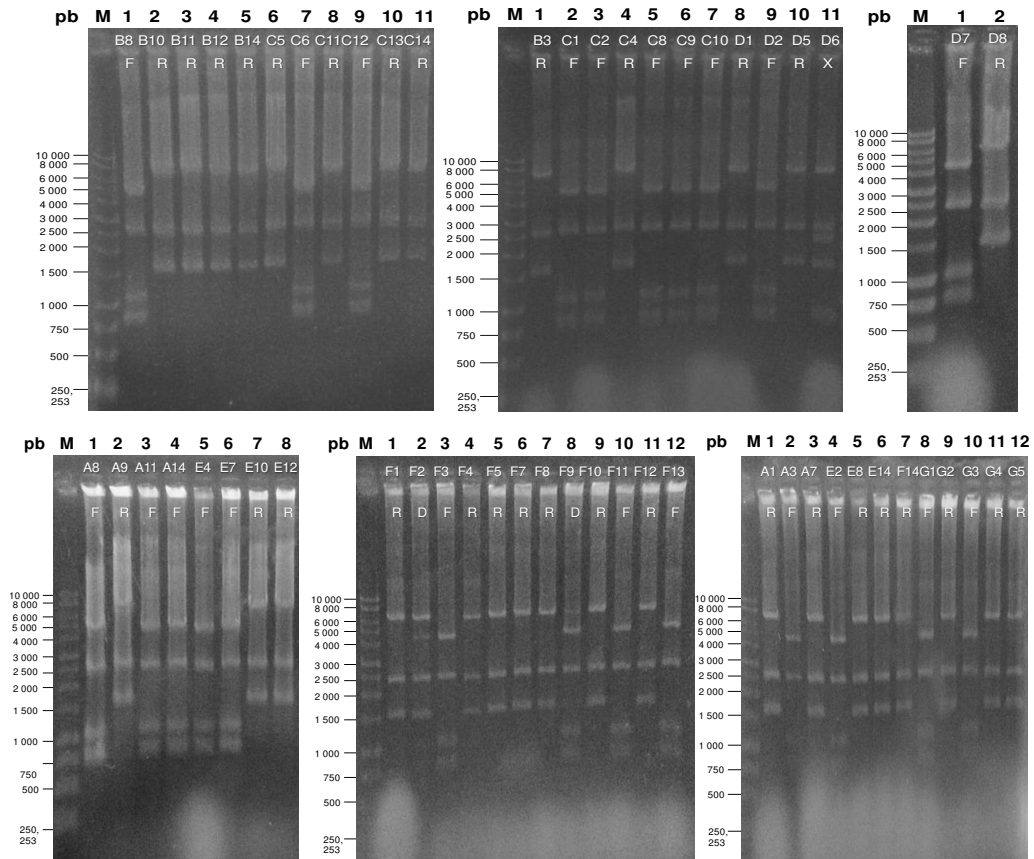
Debido a que ninguno de los plásmidos caracterizados resultó ser el pGAHbGalgs correcto, se decidió hacer análisis por PCR de conjuntos de 14 colonias resultantes de la transformación con la ligación del tercer intento de construcción del plásmido pGAHbGalgs (6.4.7.8). El resultado de la electroforesis con post-tinción (**Figura 99**) mostró bandas del tamaño esperado en todos los conjuntos de colonias, aunque con una amplificación muy débil, por lo que se asumió que debía haber colonias que contuvieran el plásmido pGAHbGalgs correcto. Por lo tanto, se procedió a realizar una serie de cultivos de las colonias resembradas para caracterizar sus plásmidos mediante análisis de restricción.



**Figura 99.** Reacciones de PCR con el par de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS de los conjuntos de colonias de la tercera construcción. La tinción del gel se realizó sumergiendo el gel en GelRed 3X por al menos 30 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 80 min, agarosa 0.8 %. Carril M1: marcador 100 bp Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Carril 1: control negativo de PCR (10  $\mu$ L). Carril 2: control positivo de PCR (pGAHbGalgs de la segunda construcción) (2  $\mu$ L). Carriles 3 a 9: PCR de los conjuntos de colonias A, B, C, D, E, F, G, respectivamente (10  $\mu$ L). Carril M2: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L).

### 7.3.5.6. Caracterización por análisis de restricción de los plásmidos extraídos de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con la ligación pGAHbGalgs de la tercera construcción (II)

El resultado de los análisis de restricción con la enzima BglIII de plásmidos extraídos de las colonias cultivadas por separado (**Figura 100**) de los diferentes conjuntos analizados por PCR mostró principalmente los dos patrones de restricción ya descritos: de tres bandas (“rearreglado”, por lo mencionado en la descripción del panel A de la **Figura 98**) y de cuatro bandas (pGAHFTEII). Además, en una de las colonias (D6) se obtuvo un patrón de 5 bandas y en dos colonias (F2 y F9) se obtuvo un patrón semejante a una mezcla de los dos patrones más frecuentes.

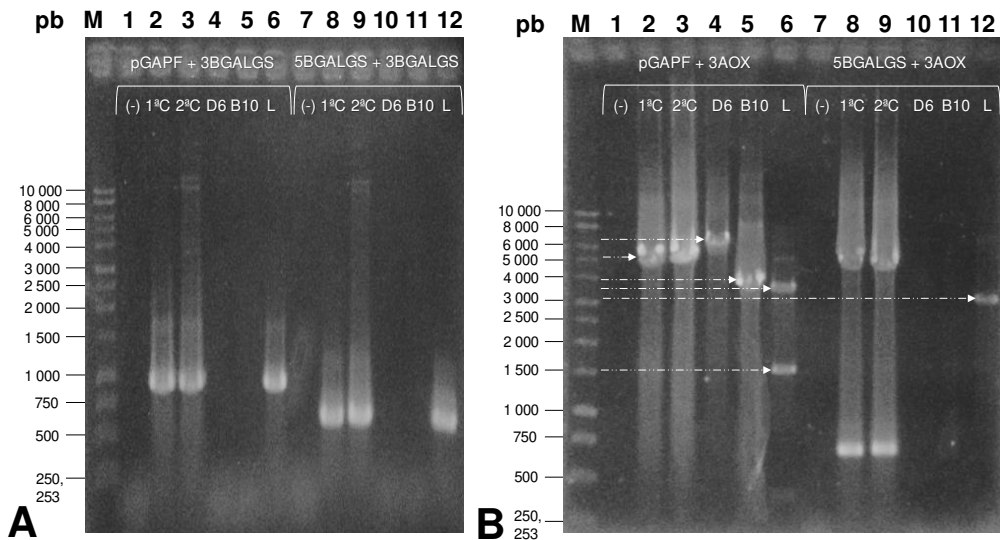


**Figura 100.** Caracterización mediante análisis de restricción con BglIII de plásmidos extraídos de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con la ligación de la tercera construcción de pGAHbGalgs. En la parte superior de los carriles de cada gel se indica la colonia de origen de la muestra de DNA plasmídico empleada. En la parte inferior de los pocillos se indica el tipo del patrón de bandas de la digestión. R: patrón “rearrreglado”, F: patrón de pGAHFTEII, X: patrón único en los análisis realizados, D: mezcla de patrones R y F. La tinción de los geles se realizó sumergiendo el gel en GelRed 3X por al menos 30 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 70 min, agarosa 0.8 %. Carril M: marcador 1kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L). Resto de carriles: digestiones con BglIII de los plásmidos de la colonia indicada en la parte superior (10  $\mu$ L).

### 7.3.5.7. Caracterización mediante PCR de los plásmidos de las colonias de las tres construcciones

Los resultados de la electroforesis con post-tinción de las reacciones de PCR de los plásmidos pGAHbGalgs de la primera y segunda construcciones y los plásmidos de las colonias D6 y B10 y la ligación de la tercera construcción (**Figura 101**) mostraron que los plásmidos nombrados como pGAHbGalgs de la primera y segunda construcciones, y la ligación de la tercera construcción generaron amplicones correspondientes al tamaño esperado con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS (921 pb) y 5BGALGS y 3BGALGS (626 pb). Sin embargo, los plásmidos de las colonias D6 y B10 de la tercera construcción no mostraron amplificación con dichos pares de oligonucleótidos. Solamente

la ligación de la tercera construcción mostró bandas en los tamaños esperados para el pGAHbGalgs teórico con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3AOX (3389 pb) y 5BGALGS y 3AOX (3094 pb). Además, mostró una banda cercana a la esperada para el plásmido pGAHFTEII con los oligonucleótidos pGAPF y 3AOX (1475 pb), confirmando contaminación con dicho plásmido. Los tamaños de los amplicones con los oligonucleótidos pGAPF y 3AOX de los plásmidos pGAHbGalgs no coincidieron con lo teórico: los de la primera y segunda construcciones presentaron una banda de cerca de 5000 pb, el de la colonia D6, una de 7000 pb y el de la colonia B10, una de 4000 pb. En las reacciones con los oligonucleótidos 5BGALGS y 3AOX, los plásmidos de la primera y segunda construcciones mostraron dos bandas y no una, indicando la presencia de inespecificidades o de alteraciones en el plásmido. No se presentó amplificación con estos oligonucleótidos en los plásmidos de D6 y B10. La amplificación con los oligonucleótidos 5BGALGS y 3AOX de la ligación de la tercera construcción fue la única que presentó una banda cercana al tamaño teórico de 3094 pb.



**Figura 101.** PCR para caracterización de plásmidos pGAHbGalgs de las tres construcciones llevadas a cabo, y de la ligación empleada en la tercera construcción. En la parte superior de los carriles se indica el par de oligonucleótidos y las muestras que se utilizaron para los ensayos. (-): control negativo, 1<sup>o</sup>C: pGAHbGalgs de la colonia 1 de la primera construcción, 2<sup>o</sup>C: pGAHbGalgs de la colonia 8B de la segunda construcción, D6: pGAHbGalgs de la colonia D6 de la tercera construcción, B10: pGAHbGalgs de la colonia B10 de la tercera construcción, L: ligación de la tercera construcción. La tinción de los gels se realizó sumergiéndolos en GelRed 3X por 60 min. Condiciones de corrimiento: 100 V, 84 mA, 60 min, agarosa 0.8 %. Carriles M: marcador 1 kb Ladder (Promega) (0.7  $\mu$ L) A) Electroforesis de PCR con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS (carriles 1 a 6), y 5BGALGS y 3BGALGS (carriles 7 a 12) (5  $\mu$ L). B) Electroforesis de PCR con los pares de oligonucleótidos pGAPF y 3AOX (carriles 1 a 6), y 5BGALGS y 3AOX (carriles 7 a 12) (5  $\mu$ L).

En la **Tabla 99** y la **Tabla 100** se resumen los resultados de las caracterizaciones, por análisis de restricción o por PCR, de los plásmidos empleados u obtenidos durante los tres intentos de construcción de pGAHbGalgs.

**Tabla 99.** Resumen de las caracterizaciones mediante análisis de restricción de los plásmidos pCC1-b-GalgsE, pGAHbGalgs y pGAHFTEII, empleados u obtenidos durante los tres intentos de construcción.

Plásmido caracterizado	Tamaño de fragmentos de restricción (en pb) obtenidos con las enzimas:					
	BglIII	BglIII + XhoI	HindIII	HindIII + BglIII	XhoI + Csp45I	BglIII + Csp45I
<b>pCC1-b-GalgsE*</b> Empleado en C1	<b>5040 (~6200)</b>	3971	10013			
	3971	3258	1065			
	2067	2067	<b>+Ex: 950</b>			
		<b>1782 (~3000)</b>	<b>+Ex: 400</b>			
T: 11087 pb				NC	NC	NC
O: 12320 pb	85/A/1	85/B/2	91/-/6			
D: 1233 pb	85/B/1		93/A/8			
	91/-/5					
<b>pGAHbGalgs</b> Resultantes de C1 y C2	5599	5599	7355	4028		
	<b>2516 (~4000)</b>	2379	2062	2379	<b>6884</b>	5102
	2379	<b>1782 (~3200)</b>	1065	1065	(~9000)	<b>2033</b>
		734	<b>+Ex: 950</b>	948	3359	(~3400)
T: 10494 pb			<b>+Ex: 400</b>	503	251	497
O: 12004 pb				<b>+Ex: 950</b>		483
D: 1510 pb				<b>+Ex: 400</b>		
	85/A/2,3,6	85/B/4,8	88/-/5	88/-/6	88/-/2	88/-/4
	85/B/3,7	88/-/3				
	88/-/1					
<b>pGAHbGalgs</b> Resultantes de C3, plásmidos tipo R**	<b>5599 (~6500)</b>		<b>7355</b>			
	<b>2516 (~1550)</b>		<b>2062</b>			
	2379		<b>1065</b>			
			<b>(&gt;10000)</b>			
T: 10494 pb	97/B/2,3	NC		NC	NC	NC
O: 10429 pb	97/C/4,5		97/A/2,3			
D: 65 pb	Carriles R de Figura 100		97/B/5,6			
<b>pGAHFTEII</b> Empleado en C1, C2 y C3, o residuo de purificación incompleta del vector (40 % de plásmidos analizados en C3) T y O: 8580 pb	4402	4402				
	2379	2379				
	1025	774				
	774	734				
		291				
			NC	NC	NC	NC
	88/-/7					
	97/B/4					
	97/C/2,3	88/-/8				
	Carriles F de Figura 100					



Los números en **negrita** indican diferencia entre el tamaño teórico (números tachados) y el tamaño observado (números entre paréntesis) de las bandas. El resto de los números corresponde a los tamaños teóricos de las bandas que no presentaron diferencia con los tamaños observados. En la parte inferior de cada caracterización se presentan en *itálicas* las claves de las evidencias que respaldan la caracterización. Clave de las evidencias: número de figura/panel de figura/carril(es).

C1: primera construcción, C2: segunda construcción, C3: tercera construcción, T: tamaño teórico, O: tamaño observado (promedio de los tamaños estimados del plásmido en cada caracterización), D: diferencia de tamaño entre teórico y observado, +Ex: bandas extra (bandas adicionales cuando se observaron todas las teóricas), NC: no se realizó la caracterización.

\*La caracterización de los plásmidos pCC1-b-GalgsL empleados en la segunda y tercera construcción sí coincidió con el tamaño teórico (evidencias C2: 85/A/4, 85/B/6, evidencias C3: 91/-/2,3, 93/A/5), por lo que no se incluyen en la tabla.

\*\*Entre los plásmidos resultantes de la tercera construcción analizados se encontró uno (proveniente de la colonia D6, equivalente al 1.5 % de los plásmidos analizados) que presentó un patrón de restricción con BglIII similar al de la mayoría de los plásmidos de la tercera construcción (plásmidos tipo R), con la diferencia de que presentaron dos bandas extra de 2300 y 1000 pb (cinco bandas en total) (evidencia: Figura 100, colonia D6)

**Tabla 100.** Caracterización por PCR de los plásmidos pGAHbGalgs resultantes de los tres intentos de construcción, y de las reacciones de ligación de las cuales derivaron.

C	Primers empleados en la caracterización por PCR	Tamaño de producto amplificado (pb)			Evidencias	
		TEÓRICO	PLÁSMIDO	LIGACIÓN	PLÁSMIDO	LIGACIÓN
1	pGAPF + 3BGALGS	921	~930	~930	<i>66/A/4-12, 66/B/1-3 79/-/3</i>	<i>66/A/2</i>
	5BGALGS + 3AOX	<b>3094</b>	<b>~5000 y ~700</b>	ND	<i>101/B/8</i>	<i>ND</i>
2	pGAPF + 3BGALGS	921	~930	~930	<i>77/C/2, 78/-/6 79/-/1-2</i>	<i>77/C/1 78/-/9</i>
	5BGALGS + 3AOX	<b>3094</b>	<b>~5000 y ~700</b>	ND	<i>101/B/9</i>	<i>ND</i>
3	pGAPF + 3BGALGS	<b>921</b>	<b>~1900 (AT)* ~900 y ~1900 (AT)**</b>	~900	<i>99/-/3-9 (AT) 101/A/4-5 (SA)</i>	<i>101/A/6</i>
	5BGALGS + 3BGALGS	<b>626</b>	<b>SA</b>	~600	<i>101/A/10-11 (SA)</i>	<i>101/A/12</i>
	pGAPF + 3AOX	<b>3389</b>	<b>B10: ~4000 D6: ~6500</b>	~3500***	<i>B10: 101/B/5 D6: 101/B/4</i>	<i>101/B/6</i>
	5BGALGS + 3AOX	<b>3094</b>	<b>SA</b>	~3100	<i>101/B/10-11</i>	<i>101/B/12</i>

Números en **negrita** indican diferencias entre el tamaño teórico y el observado.

C: número del intento de construcción del plásmido, ND: no disponible (amplificación no realizada), SA: sin amplificación, AT: amplificación tenue en comparación con resultados de otras PCR. Clave de las evidencias: número de figura/panel de figura/carril(es).

\*Solo en ciertas colonias. \*\*En conjuntos de colonias. \*\*\*También se presentó una banda de 1500 pb, correspondiente a contaminación con plásmido FTEII que no pudo removerse en la purificación del vector pGAH.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Introducción

En el presente trabajo se buscó evaluar el impacto de la lactosa, comparada con otras fuentes de carbono como glucosa o glicerol, en el comportamiento metabólico y en la producción de proteínas heterólogas cuyas secuencias génicas son reguladas por el promotor *AOX1* en cepas de *Pichia pastoris* modificadas genéticamente para utilizar lactosa como fuente de carbono. A pesar de la existencia de un considerable número de cepas recombinantes de *P. pastoris* productoras de  $\beta$ -galactosidasas (referidas previamente en la **Tabla 2**), existe poca información sobre el cultivo de éstas en medio con lactosa para la generación de biomasa; y el uso de biomasa de *P. pastoris* generada en cultivos con lactosa para la producción de proteínas heterólogas reguladas por  $P_{AOX1}$  se ha reportado únicamente en el grupo de trabajo de forma preliminar (Balderas-Cisneros 2016).

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas KM71LAC412, KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC, rediseñadas genéticamente para expresar una  $\beta$ -galactosidasa intracelular y una permeasa de lactosa, emplearon lactosa como fuente de carbono y generación de biomasa; y que el uso de lactosa por estas cepas, en distintas condiciones de cultivo, afectó de forma diferencial los niveles de expresión de genes heterólogos regulados por  $P_{AOX1}$  y  $P_{GAP}$  y de otros genes del organismo en comparación con los cultivos en otras fuentes de carbono, tales como glucosa o glicerol.

El análisis de los transcriptomas de las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9 mostró que la inserción de los genes *LAC4* y *LAC12* afectó la expresión genética de forma global, y que además el cultivo en lactosa en comparación con glucosa modificó la expresión de alrededor de cerca del 40 % de los genes, entre los cuales se encontraron los genes relacionados en el aprovechamiento de la fuente de carbono, como los de las vías del metabolismo central y de transportadores de carbohidratos. Las muestras de los cultivos en medio con glucosa de KM71LAC412 y KM71pPIC9 se extrajeron a las 30 h, cuando los cultivos se encontraban en fase estacionaria, mientras que las muestras del cultivo de KM71LAC412 en medio con lactosa se extrajeron en una fase distinta de crecimiento

debido al comportamiento propio de esta cepa en lactosa en comparación con glucosa. Por lo tanto, es posible que existan otros factores involucrados en el cambio de la expresión genética entre los cultivos con lactosa y glucosa, como la fase de crecimiento. Sin embargo, la comparación de los transcriptomas de las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9 cultivadas en glucosa mostró efectivamente el impacto de la inserción de *LAC4* y *LAC12*, ya que ambas cepas se encontraban en la misma fase de crecimiento.

Los niveles de expresión de genes heterólogos regulados por  $P_{AOXI}$  y  $P_{GAP}$  se evaluaron tanto a nivel transcripcional como a nivel de rendimiento de proteína heteróloga por biomasa. Para la evaluación a nivel transcripcional no fue posible contar con triplicados biológicos de todas las condiciones evaluadas debido a la pérdida de muestras en el procesamiento para la extracción de RNA por no contar con la suficiente calidad para el análisis, y por limitación de reactivos. Sin embargo, el análisis de todas las condiciones de cultivo mostró tendencias generales de expresión en algunos genes, entre los que se encuentran los del metabolismo del metanol, lo cual permitió obtener conclusiones respecto a su comportamiento de expresión. La evaluación a nivel de proteína heteróloga contó con triplicados en todas las condiciones analizadas y con duplicados para la evaluación de los niveles de hGH, por lo que este análisis es estadísticamente confiable. Se podría considerar que el análisis de la expresión a nivel de rendimiento de proteína recombinante tiene una mayor relevancia en procesos biotecnológicos, ya que es el parámetro que se busca mejorar, independientemente de los niveles transcripcionales del gen codificante de la proteína.

No fue posible generar una cepa de *P. pastoris* productora de una  $\beta$ -galactosidasa extracelular, ya que se presentaron alteraciones de la secuencia heteróloga durante la construcción y propagación del vector que se emplearía para la transformación de dicha levadura. Estas alteraciones consistieron en modificaciones de la secuencia de los plásmidos por parte de las cepas de *E. coli* empleadas para propagar las construcciones del vector. Se realizaron tres intentos de construcción del plásmido, en el último de los cuales se realizó una caracterización exhaustiva de los plásmidos generados. Sin embargo, todos los intentos de construcción generaron plásmidos que contenían una versión de la secuencia heteróloga b-Galgs (caracterizada por PCR) con modificaciones, como

inserciones. Los plásmidos con la secuencia b-Galgs modificada, generados en los dos primeros intentos de construcción, se emplearon para la transformación de *P. pastoris*, resultando en células sin actividad de  $\beta$ -galactosidasa.

## **8.2. OBJETIVO 1. Evaluación de comportamiento metabólico y análisis de los perfiles transcripcionales de las cepas KM71LAC412 y una cepa control cultivadas en lactosa, glucosa y glicerol**

### **8.2.1. Introducción**

La cepa de *P. pastoris* KM71LAC412 contiene las secuencias *LAC4* y *LAC12* integradas en su genoma. Dado que esta cepa mostró consumo y crecimiento en lactosa (a diferencia de la cepa control sin los genes *LAC*), se demostró que emplea la lactosa como fuente de carbono y que las secuencias de los genes *LAC* fueron funcionales. Por lo anterior, la integración de *LAC4* y *LAC12* en el genoma de KM71LAC412 le confirió el fenotipo Lac<sup>+</sup>, como se describió en el artículo de la primera construcción de *S. cerevisiae* recombinante capaz de consumir lactosa (Sreekrishna y Dickson 1985). La caracterización fenotípica de KM71LAC412 se realizó por el crecimiento de la cepa en BMLac y por la determinación de su actividad de  $\beta$ -galactosidasa. La caracterización genotípica por PCR de las células que crecieron en BMLac indicó la presencia de los genes *LAC* que dan la identidad genética a esta cepa.

El sistema de expresión requerido para producir una cepa de *P. pastoris* capaz de crecer en un medio con lactosa debe ser constitutivo si se desea que el organismo consuma lactosa continuamente. Por esta razón, el vector de expresión de los genes *LAC* se diseñó para estar regulado por el promotor constitutivo P<sub>GAP</sub>. Existen reportes previos de producción constitutiva de  $\beta$ -galactosidasa en *P. pastoris* con diversos objetivos (Hildebrandt et al. 2009; Sampedro et al. 2012; Wanarska y Kur 2012; Larsen et al. 2014), pero ninguno de estos pretendía producir biomasa de *P. pastoris* en cultivo con lactosa. Los estudios en los que *P. pastoris* modificada genéticamente es cultivada en lactosa como única fuente de carbono son limitados. Solamente existe un reporte en el cual una cepa de *P. pastoris* productora de una  $\beta$ -D-galactosidasa de *A. chlorophenicus* se cultivó en un medio con lactosa como única fuente de carbono y en permeado de suero (Wanarska y Kur 2012). Debido a que el objetivo de dicho estudio era producir tagatosa a partir de la

galactosa liberada, no se reportaron los rendimientos de biomasa en lactosa o la factibilidad de usarla para la generación de biomasa en bioprocesos con *P. pastoris*, aunque el estudio reportó menor rendimiento de hidrólisis a mayor concentración de lactosa.

Un factor considerado en la elección del gen empleado para la modificación de la cepa de *P. pastoris* fue que la  $\beta$ -galactosidasa producida presentara actividad a las condiciones de cultivo de la levadura. Para realizar la construcción de la cepa KM71LAC412 (Castillo-Galván, tesis por publicar), se eligió la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* debido a que su temperatura y pH óptimos (35 °C y 7, respectivamente) (Pereira Rodríguez et al. 2006) son cercanos a las condiciones de cultivo de *P. pastoris*, (30 °C y pH 6). Otras razones para considerar esta enzima incluyeron su extendido uso en aplicaciones industriales, que ha sido caracterizada, y la cercanía taxonómica a *P. pastoris* de la levadura que la produce nativamente.

En el grupo de trabajo se intentó además producir la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* de forma extracelular en *P. pastoris* (Castillo-Galván, tesis por publicar) utilizando un vector que contenía el péptido señal derivado del factor alfa de *S. cerevisiae* (pGAPZ $\alpha$ A). Aunque la proteína se produjo y se secretó al medio (confirmado por SDS-PAGE), la enzima no presentó actividad, presumiblemente por un ensamblaje incorrecto o alterado de las subunidades al momento de formar la estructura cuaternaria. Este resultado fue similar a los resultados obtenidos en otros estudios (Souza Macêdo 2001; Liu 2004), en los cuales la expresión de una  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces* sp. en *P. pastoris* resultó en la ausencia de actividad de  $\beta$ -galactosidasas extracelular. La dificultad en la secreción de  $\beta$ -galactosidasas intracelulares también se ha reportado previamente (Pereira Rodríguez et al. 2006), lo cual fue motivo para posteriormente intentar producir en *P. pastoris* una  $\beta$ -galactosidasa que fuera extracelular en su forma nativa en el presente trabajo. Sin embargo, la generación de la cepa de *P. pastoris* productora de  $\beta$ -galactosidasa extracelular no fue posible por los motivos que se discutirán en un apartado subsecuente.

## 8.2.2. Parámetros fisiológicos de las cepas KM71LAC412 y una cepa control en diferentes fuentes de carbono

### 8.2.2.1. Velocidad de crecimiento específico, rendimiento de biomasa por unidad de sustrato y velocidad de consumo específico de sustrato

La  $\mu$  promedio de KM71LAC412 en lactosa, obtenida durante el crecimiento exponencial de la cepa ( $\mu = 0.012 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ ), presentó valores cercanos al 4 % de la  $\mu$  presentada en glucosa y glicerol. Las  $\mu$  de los cultivos en glucosa y glicerol de esta cepa no presentaron diferencias significativas entre sí, y tampoco con las de la cepa control en estos dos sustratos. Lo anterior demuestra que la integración de *LAC4* y *LAC12* no generó carga metabólica cuando la cepa es crecida en glucosa y glicerol, al no afectar la velocidad específica de crecimiento.

La cinética de crecimiento de KM71LAC412 en lactosa presentó una fase inicial de crecimiento exponencial ( $\mu = 0.162 \pm 0.035 \text{ h}^{-1}$ ) durante las primeras 12 h de cultivo, debido probablemente a la presencia de fuente de carbono remanente del cultivo de activación. Después, el cultivo entró en una fase lag prolongada, para posteriormente reanudar su crecimiento exponencial de las 78 a las 168 h, aunque con una menor  $\mu$  ( $\mu = 0.012 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ ).

La velocidad de consumo específica de lactosa presentó un comportamiento lineal negativo a lo largo del tiempo de cultivo (264 h) con un máximo de velocidad de consumo específica a las 96 h del cultivo (0.618 mmol/gDCW h o 0.213 g/gDCW h). A pesar de que la velocidad de consumo específica de KM71LAC412 fue un 30 % más baja que la reportada para *K. lactis* JA6 (un organismo que presenta el gen *LAC12* de forma nativa) para células crecidas en lactosa ( $0.94 \pm 0.12 \text{ mmol/gDCW h}$ ) (Santos et al. 2014), el consumo de lactosa no se reflejó en el crecimiento durante las primeras 78 h, e incluso la concentración de lactosa en el medio de cultivo se mantuvo a la concentración inicial a las 24 h. Asimismo, la  $\mu$  promedio de KM71LAC412 ( $\mu = 0.012 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ ) fue menor que las  $\mu$  de otras levaduras modificadas cultivadas en medios con lactosa. En un cultivo con lactosa 2 % y pH 4.5, una cepa de *S. cerevisiae* modificada genéticamente con los genes *LAC4* y *LAC12* de *K. lactis* obtuvo una  $\mu$  de  $0.14 \text{ h}^{-1}$ , y esta misma cepa después de un proceso de adaptación evolutiva alcanzó una  $\mu$  de  $0.21 \text{ h}^{-1}$ , aunque no lograron alcanzar la  $\mu$  de *K. lactis*, de  $0.28 \text{ h}^{-1}$  (Guimarães et al. 2008b). En otro estudio, una cepa de

*S. cerevisiae* modificada para producir una  $\beta$ -galactosidasa de *A. niger* cultivada con lactosa 4 % obtuvo  $\mu$  de  $0.1 \text{ h}^{-1}$  a pH 5.5 y  $0.14 \text{ h}^{-1}$  a pH 4.5 (Ramakrishnan y Hartley 1993). En comparación, en el presente estudio, la  $\mu$  promedio en lactosa de *P. pastoris* KM7LAC412 fue aproximadamente 10 veces menor que la obtenida por las cepas modificadas de *S. cerevisiae* previamente mencionadas y por *K. lactis*.

El crecimiento sin diferencias en glucosa y glicerol en las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9 indicó que el recurso energético generado y empleado para la producción de biomasa fue semejante en estas dos fuentes de carbono en las dos cepas, además, el crecimiento alcanzado fue semejante a trabajos previos reportados en la literatura, indicando la ausencia de una carga metabólica que afectara su crecimiento debido a la expresión de los dos genes heterólogos regulados de forma constitutiva por  $P_{GAP}$ . Las  $\mu$  estimadas para la cepa KM71LAC412 en BMGlc (glucosa 0.54 %) y BMGly (glicerol 0.28 %) ( $0.304 \pm 0.013$  y  $0.288 \pm 0.057 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente) y para la cepa KM71pPIC9 en BMGlc y BMGly ( $0.293 \pm 0.004$  y  $0.292 \pm 0.072 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente) fueron cercanas a las reportadas previamente para cultivos en lote de *P. pastoris* en glicerol y glucosa. Los valores reportados de  $\mu$  para *P. pastoris* (cepa CBS7435) cultivada en medio mínimo amortiguado suplementado con glucosa al 2 % (p/v) o glicerol al 1 % (p/v) fueron  $0.25 \pm 0.03$  y  $0.19 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente (Geier et al. 2015). Otro estudio reportó valores de  $\mu$  para *P. pastoris* (cepa DSMZ 70382) de  $0.19 \text{ h}^{-1}$  para glucosa (medio YPD, que incluye 2 % de glucosa) y  $0.26 \text{ h}^{-1}$  para glicerol (medio BMGY, que incluye 1 % de glicerol) (Mattanovich et al. 2009). Los valores de  $\mu$  obtenidos en el presente estudio para glucosa y glicerol fueron ligeramente más altos en comparación con los reportados en la literatura, sin embargo, como se observa en esos mismos reportes, la  $\mu$  es variable según la cepa y el medio de cultivo. Sin embargo, se puede concluir que la expresión constitutiva de los genes *LAC* no ocasiona carga metabólica adicional, como lo demostró la ausencia de diferencia significativa entre las  $\mu$  de las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9, tanto en BMGlc como en BMGly.

Los rendimientos  $Y_{x/s}$  expresados en distintas unidades para la fuente de carbono proporcionan información distinta. El  $Y_{x/s}$  por mol de sustrato indica la eficiencia de cada una de las moléculas para generar biomasa y comparando estos rendimientos se podrá

inferir si se están usando rutas metabólicas alternas para asimilar la molécula y si la energía generada se emplea para generar biomasa, calor o energía para el mantenimiento celular. La comparación del  $Y_{x/s}$  por mol de carbono es un indicativo en la eficiencia del uso de la fuente de carbono para la generación de biomasa, a igualdad de rendimientos significaría que estos sustratos generan la misma energía que se utiliza para la conversión de biomasa; los sustratos con menores rendimientos por mol de carbono indicarían que sus carbonos no se utilizan, o se utilizan por rutas alternas que generan menor energía y la pierden en forma de calor o que la energía la usan para el mantenimiento celular. El  $Y_{x/s}$  por gramo de sustrato busca comparar como aprovecha cada cepa cada fuente de carbono, y determinar que fuente de carbono ofrece mayor rendimiento por gramo de sustrato.

La diferencia significativa entre los  $Y_{x/s}$  en lactosa de las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9 demostró la funcionalidad de los dos genes heterólogos *LAC4* y *LAC12* y la asimilación de la lactosa por la cepa KM71LAC412, ya que los rendimientos en lactosa calculados para KM71LAC412, tanto por gramo y mol de sustrato como por mol de carbono, fueron 18 veces más altos que los de KM71pPIC9 en lactosa. A pesar de lo anterior, los  $Y_{x/s}$  por gramo de sustrato de otros organismos cultivados en lactosa fueron superiores a los obtenidos por KM71LAC412 cultivada en lactosa. Como ejemplo, el  $Y_{x/s}$  por gramo de lactosa de *Kluyveromyces marxianus*, una levadura del mismo género que *K. lactis* (origen de los genes *LAC4* y *LAC12*) fue de 0.36 gDCW/g cuando se cultivó en suero con una concentración de lactosa de 4.72 %, de 0.32 gDCW/g en suero concentrado dos veces y de 0.31 gDCW/g en suero concentrado tres veces (Araujo et al. 2007). En un organismo genéticamente modificado para utilizar lactosa, como *S. cerevisiae*, se obtuvo un  $Y_{x/s}$  por gramo de lactosa de 0.19 gDCW/g en un cultivo con lactosa 2 %, disminuyendo a 0.07-0.10 gDCW/g en concentraciones más altas (Guimarães et al. 2008c). Los datos reportados anteriormente indican que el  $Y_{x/s}$  disminuye al aumentar la concentración de lactosa. En comparación, el  $Y_{x/s}$  por gramo de lactosa de la cepa KM71LAC412 en BMLac (lactosa 30 mM o 1 %) fue de  $0.120 \pm 0.031$  gDCW/g, lo cual está dentro del rango obtenido para *S. cerevisiae* modificada (Guimarães et al. 2008c). Sin embargo, se debe recordar que *S. cerevisiae* es capaz de metabolizar la molécula de galactosa liberada de la lactosa, mientras que *P. pastoris* no.



El  $Y_{x/s}$  por gramo de sustrato de las cepas KM71pPIC9 y KM71LAC412 no mostró diferencias significativas entre las cepas, tanto en BMGlc y BMGly de cada cepa, aunque el valor en glucosa fue un 18 % más bajo que el de glicerol. Sin embargo, los  $Y_{x/s}$  por mol de sustrato obtenidos en BMGlc para cada cepa fueron al menos 1.5 veces más altos que su respectivo cultivo en BMGly, con diferencia estadísticamente significativa. Los  $Y_{x/s}$  por gramo de sustrato en BMGlc y BMGly de KM71pPIC9 y KM71LAC412 (en promedio 0.360 gDCW/g para glucosa y 0.437 gDCW/g para glicerol) fueron similares a los reportados en otro estudio para cultivos en biorreactor en lote alimentado, con valores de 0.35 gDCW/g para glucosa y 0.51 gDCW/g para glicerol (Tang et al. 2009). En un estudio, que empleó cultivos de *P. pastoris* en quimiostato en condiciones limitantes de glucosa (Rebnegger et al. 2014), se reportaron rendimientos de biomasa sustrato dependientes de la velocidad específica de crecimiento, con valores de 0.37 a 0.52 gDCW/g a valores de  $\mu$  de 0.015 a 0.15 h<sup>-1</sup>. Un reporte adicional de cultivos en quimiostato de *P. pastoris* con glucosa limitada (Rebnegger et al. 2016) menciona un rendimiento de 0.584 g/gDCW.

Los resultados variables en los rendimientos generados por glucosa parecen depender del tipo de cultivo y de las velocidades específicas de crecimiento. En este trabajo, el rendimiento de biomasa generado por glucosa, en cultivos con un valor promedio de  $\mu$  de 0.304 h<sup>-1</sup>, fue menor que a los generados en cultivos en quimiostato en condiciones limitantes de glucosa, con un valor que va de 60 a 95 % de los valores reportados (Rebnegger et al. 2014; 2016), sin embargo, fue igual al reportado a partir de un cultivo en lote en biorreactor (Tang et al. 2009). En el presente trabajo, el rendimiento de biomasa en glicerol fue 15 % más bajo que el reportado para el cultivo en lote en biorreactor (Tang et al. 2009), a pesar de que presentaron valores de  $\mu$  promedio similares: ~0.290 h<sup>-1</sup> en el presente estudio contra 0.266 h<sup>-1</sup> en el lote en biorreactor.

La cinética de consumo de sustrato determina la velocidad específica de crecimiento (Mattanovich et al. 2009). Debido a la presencia de 4 transportadores de glicerol, *P. pastoris* presenta velocidades de consumo de glicerol más altas (0.37 g/gDCW/h) que las reportadas para *S. cerevisiae* (0.046 g/gDCW/h) (Mattanovich et al. 2009). Incluso se ha reportado que la expresión en *S. cerevisiae* de un homólogo de un transportador de

glicerol de *P. pastoris* mejoró significativamente su rendimiento de biomasa en glicerol, con un valor de 0.56 gDCW/g (Klein et al. 2016). Por otro lado, la tasa de captación de glucosa excepcionalmente alta para *S. cerevisiae*, se atribuye a su abundancia de transportadores de hexosa (más de 10), resultando en un valor de consumo específico de glucosa de 2.88 g/gDCW/h para un cultivo de *S. cerevisiae* totalmente aeróbico. En contraste, la tasa de captación de glucosa específica se limita a 0.35 g/gDCW/h (a una  $\mu$  cercana a 0.193 h<sup>-1</sup>) en cultivos en quimiostato de *P. pastoris*, ya que sus tres transportadores de glucosa y un sensor de membrana de glucosa (Prielhofer et al. 2015) dan lugar a una limitada captación de glucosa.

Se esperaría teóricamente que los cultivos de KM71LAC412 en BMLac mostraran  $Y_{x/s}$  por mol similares a los de los cultivos en BMGlc, ya que ambos se realizaron a concentraciones equimolares de sustrato y la lactosa tiene una unidad de glucosa por molécula. Sin embargo, el  $Y_{x/s}$  por mol de lactosa ( $41.070 \pm 10.551$  gDCW/mol) fue más cercano al de glicerol ( $40.429 \pm 3.991$  gDCW/mol) que al de glucosa ( $65.798 \pm 4.594$  gDCW/mol). Una posible explicación consiste en que, debido al mayor tiempo que les tomó alcanzar la fase exponencial y a que la fase exponencial del cultivo en BMLac abarcó más tiempo que las de los cultivos en BMGlc y BMGly, las células cultivadas en BMLac emplearon la lactosa para procesos de mantenimiento celular en lugar de generación de biomasa. Los  $Y_{x/s}$  por mol de carbono mostraron que los cultivos en lactosa de KM71LAC412 presentaron rendimientos alrededor de 3 veces menores a los de glucosa y glicerol, mientras que los rendimientos de estos dos últimos no presentaron diferencias significativas entre sí. Esto se debe a que 6 carbonos de la lactosa, correspondientes a los de la galactosa, no pueden ser empleados por *P. pastoris* para generar biomasa debido a que no cuenta con las enzimas correspondientes para su aprovechamiento. Como no asimila la galactosa, el aprovechamiento por carbono de lactosa debería aproximadamente la mitad que el de glucosa, sin embargo, fue menor a este valor teórico, lo cual quiere decir que no usó todos los carbonos de la unidad de glucosa en generar energía para producir biomasa, sino que la usó para mantenimiento o la liberó en forma de calor.

Se ha reportado la disminución en el  $Y_{x/s}$  de *P. pastoris* a menores  $\mu$  de cultivo en cultivos con glucosa limitada en quimiostato (Rebnegger et al. 2014), lo cual puede estar relacionado con el menor  $Y_{x/s}$  por mol de la cepa KM71LAC412 cultivada en BMLac en comparación con BMGlc, ya que la  $\mu$  del cultivo en BMLac ( $0.012 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ ) fue significativamente menor que la de BMGlc ( $0.304 \pm 0.013 \text{ h}^{-1}$ ).

#### **8.2.2.2. Efecto de la fuente de carbono y la fase de crecimiento en la actividad de las proteínas heterólogas necesarias para el metabolismo de lactosa: lactosa permeasa y $\beta$ -galactosidasa**

La lactosa permeasa de *K. lactis* es una proteína de membrana de 587 aa codificada por el gen *LAC12*. La captación de lactosa en *K. lactis* está mediada por un sistema de transporte inducible por lactosa y galactosa, y es un proceso activo que requiere de un sistema de generación de energía, el cual permite la acumulación intracelular de lactosa en contra de una gradiente de concentración. Las evidencias indican que la captación de lactosa por Lac12 requiere de un mecanismo simportador de protones, en el que no hay consumo directo de ATP para el transporte, sino que se ayuda por la diferencia de potencial electroquímico que se crea transportando iones a través de la membrana celular. (Domingues et al. 2010). Lac12 también puede transportar galactosa a través de la membrana celular (Sreekrishna y Dickson 1985).

Un estudio (Rigamonte et al. 2011) reportó que en *K. lactis*, el cambio a medio de cultivo con lactosa o galactosa provocaba la internalización del transportador Lac12 a concentraciones de lactosa a partir de 0.1 %, transfiriéndolo de la membrana celular hacia vesículas intracelulares. Considerando que las cinéticas de crecimiento del presente trabajo se realizaron en medio con lactosa al 1 %, este fenómeno podría ayudar a explicar el nulo consumo de lactosa de las 0 a las 24 h, sin embargo, este fenómeno no está comprobado al tratarse de organismos diferentes. El estudio previamente mencionado propuso que dicho mecanismo evita la exposición de la célula a niveles altos de lactosa que podrían ser tóxicos, y que el restablecimiento del transportador hacia la membrana dependía de la síntesis de Lac12 *de novo*. Esto podría concordar con lo observado, ya que el crecimiento gradual de *P. pastoris* en BMLac ocurre después de un periodo de adaptación a la nueva fuente de carbono.

La  $\beta$ -galactosidasa (lactasa) de *K. lactis* es una enzima intracelular que está codificada por el gen *LAC4*. Esta enzima tiene una  $K_m$  para lactosa de 12–17 mM y su pH óptimo es de alrededor de 7.25. La  $\beta$ -galactosidasa hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa. La glucosa intracelular puede entrar en la glucólisis mientras que la galactosa entra a la vía de Leloir en los organismos que presentan los genes necesarios para su metabolismo (Domingues et al. 2010).

*P. pastoris* no posee las enzimas de la vía de Leloir para metabolizar la galactosa (Kurtzman 2005). Sin embargo, recientemente en el grupo de trabajo (estudios no publicados) se determinó por BLAST contra genes homólogos de la vía de Leloir de otras levaduras y se comprobó por ensayos de RT-qPCR que *P. pastoris* posee un gen homólogo al de una de las enzimas implicadas en la vía de Leloir: una UDP-glucosa 4 epimerasa (homólogo de *GAL10* de *S. cerevisiae* [UniProt: P04397]). Sin embargo, la presencia de esta enzima no es suficiente para que *P. pastoris* pueda emplear galactosa como fuente de carbono.

La actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa (referida en U/mg de proteína intracelular) de la cepa KM71LAC412 cultivada en las tres fuentes de carbono evaluadas parece estar relacionada con la fase de crecimiento, siendo menor durante las fases lag y estacionaria de los cultivos. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa disminuyó a medida que transcurrió el tiempo de cultivo. Particularmente, la actividad específica determinada en las muestras en BMLac tuvo su máximo a las 96 h, cerca inicio de la fase exponencial, y disminuyó durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento, junto con la fuente de carbono. Esto implica que la concentración de  $\beta$ -galactosidasa se incrementó con el tiempo hasta alcanzar un máximo a las 96 h y después disminuyó a mayores tiempos de cultivo. La disminución en la actividad de  $\beta$ -galactosidasa observada en los cultivos en BMGlc y BMGly pudo deberse a que los cultivos se encontraban en la fase estacionaria de crecimiento, por lo que la expresión constitutiva regulada por  $P_{GAP}$  de  $\beta$ -galactosidasa disminuyó debido a los bajos niveles de fuente de carbono (como se discutirá en apartados posteriores), o a que se degradaron proteínas no necesarias para el mantenimiento celular (como pudiera ser la  $\beta$ -galactosidasa), ya que se ha reportado un incremento en la

degradación de proteínas y organelos superfluos en las células de *P. pastoris* al alcanzar la fase estacionaria (Tuttle y Dunn 1995; Sinha et al. 2005).

La producción, y por ende la actividad, de la  $\beta$ -galactosidasa depende de la regulación de  $P_{GAP}$ , el cuál tiende a regularse a la baja en condiciones limitantes de la fuente de carbono, sea glucosa o glicerol. Durante la fase lag del cultivo en lactosa, la fuente de carbono estuvo limitada al menos hasta las 24 h (o mayor tiempo, porque no se tiene registro de la concentración de lactosa entre las 24 y 96 h), y la velocidad de consumo específico máximo a las 96 h supone la presencia de lactosa intracelular, la cual sería hidrolizada e incrementaría el nivel de glucosa intracelular, lo cual aumentaría la expresión de  $P_{GAP}$  y la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa. Lo anterior es congruente con el incremento de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa a las 96 h. La disminución de la actividad después de ese tiempo puede ser debido a inhibición por los productos de hidrólisis de la lactosa (glucosa y galactosa), a la posible degradación de la enzima al aproximarse a la fase estacionaria y a la falta de la fuente de carbono que disminuiría la regulación de  $P_{GAP}$ , ya que los cultivos fueron en lote.

### **8.2.2.3. Relación entre el consumo de lactosa y el crecimiento de KM71LAC412**

La fase lag prolongada y la actividad específica baja (relativa al máximo) de  $\beta$ -galactosidasa a las 24 h en el cultivo en BMLac de KM71LAC412 puede deberse a mecanismos de autofagia de proteínas celulares no esenciales, entre las que se podría incluir a la  $\beta$ -galactosidasa. Se ha demostrado que cambios en la fuente de carbono resultan en la generación de una fase lag en la cual ocurren mecanismos de autofagia (Yamashita et al. 2009), por lo que cabe la posibilidad de que entre estos cambios pudiera estar la degradación de la  $\beta$ -galactosidasa y la lactosa permeasa en el cultivo de KM71LAC412 en BMLac. Si esto ocurriera, la captación y el uso de lactosa se volvería más lenta. Sin embargo, el consumo de lactosa aumentó en algún punto entre las 24 y 96 h del cultivo, lo que indica la lactosa era permeada, mas no hidrolizada, como lo mostró el crecimiento lento y la baja actividad de la  $\beta$ -galactosidasa a las 24 h. Esta baja actividad pudo haber sido causa de que el cultivo se mantuviera en fase lag hasta alcanzar un umbral en el que la actividad de  $\beta$ -galactosidasa fue capaz de liberar la suficiente fuente de

carbono para regular positivamente a  $P_{GAP}$ , aumentando por retroalimentación positiva la producción de  $\beta$ -galactosidasa e iniciando la fase de crecimiento exponencial.

La degradación de proteínas en la fase lag del cultivo está evidenciada parcialmente por los resultados del análisis del transcriptoma, que revela una sobrerrepresentación de genes relacionados con el complejo del proteasoma entre los genes sobre-expresados en el cultivo de KM71LAC412 en BMLac, y una sobrerrepresentación de genes pertenecientes a los procesos del ciclo celular entre los sub-expresados. La sobre-expresión de genes relacionados con el estrés y la sub-expresión de genes del ciclo celular a una  $\mu$  cercana a cero en *P. pastoris* ya ha sido reportada (Rebnegger et al. 2016). Ya que la  $\mu$  de KM71LAC412 en BMLac a las 30 h (tiempo de la muestra del transcriptoma) fue muy baja, debido al poco incremento celular, los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo reportado.

Otra explicación para la prolongada fase lag del cultivo en BMLac involucra la velocidad del transportador de lactosa Lac12. Un estudio del transportador Lac12 en *K. lactis* JA6 mostró que la velocidad de la captación de lactosa disminuye en células cultivadas en glucosa comparada con células cultivadas en lactosa, y que en cultivos con glucosa y lactosa combinadas, la velocidad de captación de lactosa es menor cuando el medio de cultivo contiene glucosa (Santos et al. 2014). Dado que el inóculo empleado para las cinéticas creció en medio YPD, el cual contiene glucosa, es probable que en las primeras horas de la cinética la captación de lactosa tuviera una velocidad subóptima. Adicionalmente, la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de Lac12 reportada para *K. lactis* JA6 es de  $0.94 \pm 0.12$  mmol/gDCW h para células crecidas en lactosa (Santos et al. 2014). El mismo estudio menciona que una alta concentración de galactosa inhibe el sistema de transporte de lactosa, pero no menciona los rangos de galactosa o de la inhibición. Con esta información, se puede suponer que la galactosa liberada durante el metabolismo de lactosa de KM71LAC412 inhibe en cierto grado la captación de lactosa y la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, por lo cual la disponibilidad de la glucosa para generar energía está limitada por la actividad enzimática.

### **8.2.3. Análisis de transcriptoma de las cepas KM71LAC412 y una cepa control en diferentes fuentes de carbono**

#### **8.2.3.1. Comparación de la expresión diferencial entre cepas y fuentes de carbono**

Los resultados presentados en el presente trabajo no pueden ser comparados completamente con otros trabajos previos de transcriptómica de *P. pastoris* debido a que las condiciones de evaluación principales, es decir, el efecto de la inserción de los genes *LAC* y del cultivo en lactosa, no se habían evaluado sino hasta el presente trabajo.

Como se mencionó previamente, el análisis de los transcriptomas de las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9 mostró que la inserción de los genes *LAC4* y *LAC12* (comparación CEPAS) afectó globalmente la expresión genética. En la comparación CEPAS se sobre-expresaron genes de transporte transmembranal y se sub-expresaron genes del peroxisoma en KM71LAC412 respecto a KM71pPIC9. En la comparación SUSTRATO se modificó la expresión de alrededor de cerca del 40 % de los genes. Entre los genes sobre-expresados en la comparación de SUSTRATO, es decir, en KM71LAC412 cultivada en lactosa respecto a glucosa, se presentó una marcada tendencia a procesos involucrados con el metabolismo y síntesis de proteínas, así como unión a RNA, y entre los sub-expresados se encuentran varios procesos metabólicos de compuestos. En la comparación METANOL, que examina el cultivo en lactosa con metanol respecto a únicamente lactosa, se sobre-expresaron genes relacionados con la síntesis de ribosoma, la replicación de DNA y el transporte transmembrana, mientras que se sub-expresaron los de procesos de proteasoma.

#### **8.2.3.2. Regulación de las vías del metabolismo central**

En la comparación CEPA (KM71LAC412 en comparación con KM71pPIC9), se presentó un incremento en la expresión de genes del metabolismo central, particularmente de glicólisis/gluconeogénesis y de la vía de las pentosas fosfato, que además se acentuó en la comparación de SUSTRATO, con mayor actividad en BMLac que en BMGlc. Sin embargo, esta activación del metabolismo central no se reflejó en el crecimiento de KM71LAC412 en lactosa, indicando que usó parte la energía para el mantenimiento celular en lugar de usarla por completo para la generación de biomasa. Los genes sobre-expresados en la comparación SUSTRATO sugieren una mayor actividad

metabólica de la célula en BMLac, al tener sobre-expresados una gran parte de los genes de glicólisis/gluconeogénesis y de la vía de las pentosas fosfato. Los términos GO sobre-expresados en BMLac comparados con BMGlc en KM71LAC412 sugieren que en esta condición hay un enfoque hacia la síntesis de proteínas, ejemplo de ello es la sobrerrepresentación de procesos metabólicos de compuestos organonitrogenados, procesos metabólicos de péptidos, traducción, ribosoma, procesos metabólicos de aminoácidos celulares, actividad de aminoacil-tRNA ligasa y glicosilación de proteínas entre los genes sobre-expresados. Esto puede ocurrir porque a las 30 horas el cultivo en BMLac no se encuentra en fase estacionaria, mientras que en BMGlc sí se encuentra en esta fase, sin fuente de carbono y, por lo tanto, con actividad metabólica disminuida.

### **8.2.3.3. Estado de los transportadores de carbohidratos**

Los genes de transportadores de carbohidratos en las tres comparaciones en el análisis de transcriptoma mostraron una marcada sub-expresión en el cultivo de KM71LAC412 en BMLac comparado con sus cultivos en BMGlc y BMLacMet. Es importante considerar que, al tiempo de la toma de muestra para el análisis de transcriptoma (30 h) los cultivos en BMGlc de ambas cepas se encontraban en fase estacionaria, mientras que el cultivo de KM71LAC412 en BMLac no. Considerando que la  $\mu$  de los cultivos en BMGlc se encontraba cercana a cero a las 30 h, una posible explicación para la aparente sobre-expresión de los genes de transportadores de carbohidratos en BMGlc en comparación con BMLac consiste en que, al agotarse la fuente de carbono en el medio antes de las 30 h, se pudo haber presentado un incremento en la transcripción de los genes de transportadores en BMGlc como respuesta a la baja disponibilidad de azúcares en el medio de cultivo para captar más moléculas de azúcares o a que podría estar ocurriendo un efecto similar a la represión por catabolito, desreprimiéndose los genes de transportadores de otros carbohidratos en ausencia de glucosa. A pesar de no poder confirmar o descartar estas hipótesis, en un reporte previo (Prielhofer et al. 2015) se observó una sobre-expresión general de genes de transportadores de carbohidratos en condiciones de glucosa limitada (0.25 %) en comparación con glucosa en exceso (2 %). Otra posible explicación sería que las células cultivadas en BMLac responden a la concentración de lactosa o a la galactosa liberada,



interpretándola como abundancia de sustrato y reprimiendo la expresión de los transportadores de carbohidratos.

Considerando la expresión de algunos transportadores por separado, la expresión del transportador de glucosa PpHXT1 (PAS\_chr1-4\_0570) se encontró significativamente sobre-expresada en las comparaciones CEPA y SUSTRATO, mientras que la expresión de PpHXT2 (PAS\_chr2-1\_0054) no presentó cambios significativos entre las condiciones evaluadas. De acuerdo con un estudio previo (Zhang et al. 2010), los niveles transcripcionales de PpHXT2 se encuentran inducidos a niveles bajos de glucosa (0.025 a 0.1 %), pero se reprimen de 3 a 5 veces con niveles altos de glucosa (mayores a 0.5 %). Ocurre lo contrario con los niveles transcripcionales de PpHXT1, debido a que se inducen con niveles altos de glucosa y se reprimen por niveles bajos. Se ha reportado que la expresión de PpHXT2 es cerca de 100 veces menor que la expresión de PpHXT1 en *P. pastoris* GS115 (Zhang et al. 2010), lo cual es congruente con los datos de FPKM de los transcriptomas de las dos cepas cultivadas en BMGlc: la expresión de PpHXT1 fue aproximadamente 70 y 170 veces mayor que la de PpHXT2 en las cepas KM71pPIC9 y KM71LAC412 cultivadas en BMGlc, respectivamente. Sin embargo, para KM71LAC412 cultivada en BMLac y BMLacMet, esta proporción fue mayor: 1038 y 393, respectivamente. El promotor PpHXT1 ha sido considerado como un promotor con potencial para la producción de proteínas recombinantes (Prielhofer et al. 2013), por lo tanto, el incremento en la expresión mostrado por este gen en la cepa KM71LAC412 cultivada en BMLac y BMLacMet puede ser de interés para mejorar las condiciones de producción con este promotor, ya que aparentemente el uso de la glucosa proveniente de la lactosa potencia la expresión del promotor de PpHXT1.

Otro gen transportador con un promotor de interés en la producción de proteínas recombinantes es PpHGT1 (PAS\_chr1-3\_0011), también llamado GTH1 (Prielhofer et al. 2018). Un estudio (Prielhofer et al. 2013) reportó que el promotor de PpHGT1 se encuentra estrechamente regulado por glucosa, activándose solamente cuando hay concentraciones de glucosa menores a 0.05 g/L en el medio. Los análisis de este gen en el presente estudio muestran que este gen se sub-expresó en la comparación CEPA, que no hubo diferencia en su expresión en la comparación SUSTRATO y que presentó la mayor

expresión en la cepa KM71LAC412 cultivada en BMLacMet, sobre-expresándose en la comparación METANOL. Esto significa que los niveles de glucosa disponible en la célula o el medio fueron menores en el cultivo de BMLacMet que en el resto de los cultivos evaluados (ya que el promotor se activa a concentraciones bajas de glucosa), o que existen otros factores en el medio con metanol adicionado que potencian la expresión de este gen.

#### **8.2.3.4. Estado de los genes del metabolismo de metanol**

Los genes involucrados en el metabolismo de metanol presentan una regulación variable cuando se comparan con otros resultados reportados en la literatura. En un estudio (Prielhofer et al. 2015), los genes *AOX2*, *CAT1*, *FLD*, *FGH1*, *FDH1*, *DAK2*, *DAS1*, *DAS2*, *FBP1* y *FBA2* se sobre-expresaron, y los genes *TPI1*, *FBA1*, *PGII(GPIA)* y *PFK1* se sub-expresaron en cultivos con metanol y en glucosa limitada (condición que puede ser similar al crecimiento de KM71LAC412 en BMLac) en comparación con cultivos con glucosa. En el presente trabajo, los genes *DAS1*, *DAS2*, *TPI1*, *GPIA*, *PFK1*, *FBA1* y *FBA2* se sobre-expresaron y los genes *AOX2* y *CAT1* se sub-expresaron en la comparación SUSTRATO, por lo que los perfiles de expresión de los genes presentaron diferencias entre los dos estudios. Los genes *AOX2* y *CAT1*, pertenecientes al inicio de la fase de asimilativa del metanol, se inducen con metanol y se reprimen con glucosa o glicerol. En lactosa, la presencia de glucosa por la hidrólisis de lactosa produciría un efecto de represión y en conclusión lo que veríamos sería la sub-expresión de estos genes al hacer la comparación de la fuente de carbono: en glucosa (fase estacionaria) contra lactosa (en una fase de crecimiento). Los genes sobre-expresados pertenecen a la fase asimilativa del metanol, relacionada con el metabolismo de la ruta de las pentosas, la cual está sobre-expresada en presencia de lactosa.

En cuanto a los promotores, el promotor de *DAS*, inducible con metanol, mostró una marcada sobre-expresión en FPKM en la cepa KM71LAC412 en BMLacMet, en comparación con el resto de las condiciones. Este mismo promotor indujo la sobre-expresión del gen *DAS* en la comparación SUSTRATO, es decir, mayor expresión en lactosa que en glucosa, y en la comparación METANOL (más en metanol y lactosa que en lactosa sola). Esto coincide con los reportes de que es un promotor inducible con metanol (Ellis et al. 1985).

### 8.2.3.5. Expresión diferencial de los genes *LAC4* y *LAC12*

El nivel transcripcional (en FPKM) de *LAC12* fue al menos 1.4 veces más alto que el de *LAC4* en los tres transcriptomas de KM71LAC412 (en BMGlc, BMLac y BMLacMet), y el nivel transcripcional de ambos genes fue menor que el del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAP*), controlado por el mismo promotor. Existió una sobre-expresión significativa de más de 2.5 veces de los genes *LAC4* y *LAC12* en lactosa que en glucosa en la comparación de SUSTRATO, lo cual fue inesperado debido a que ambos genes son regulados por el promotor constitutivo  $P_{GAP}$ , por lo cual se esperaría que no hubiera diferencia por el efecto de la fuente de carbono. Bajo las condiciones de BMGlc de KM71LAC412, al momento de la toma de muestra existió una posible restricción de la fuente de carbono, mientras que en BMLac, la presencia de glucosa, lactosa y galactosa podría influir en la expresión diferencial, sin embargo, estos factores no influyeron en una expresión diferencial para el gen *GAP*. Por lo anterior, se puede suponer que la transcripción de los genes *LAC4* y *LAC12* está regulada por propiedades inherentes a estas secuencias, o a diferencias entre los  $P_{GAP}$  que regulan a *LAC4*, *LAC12* y *GAP* debidas a la estrategia de construcción (las cuales se muestran en el **Anexo 2**). Incluso si las secuencias génicas de *LAC4* y *LAC12* fueron optimizadas con codones preferenciales para *P. pastoris*, al menos son 80 % similares a las nativas de *K. lactis*, lo cual pudo haber conservado sitios para regulación por factores transcripcionales. Esto se evidencia por el hecho de que los niveles (en FPKM) de transcritos de *GAP* fueron al menos diez veces más altos que los niveles de transcritos de *LAC4* y *LAC12*, cuando teóricamente se encuentran regulados por el mismo promotor.

Se ha reportado que la actividad de  $P_{GAP}$  es de dos tercios en glicerol y un tercio en metanol en comparación con medio con glucosa (Waterham et al. 1997). Estudios realizados en el grupo de trabajo (Fernández-Cano, tesis por publicar) mostraron una tendencia del gen *GAP* nativo a disminuir su expresión a medida que el tiempo de cultivo avanza y se consume la fuente de carbono, tanto en medio con glucosa como en medio con glicerol, debido a que a las 24 y 48 h de cultivo, el nivel de expresión de *GAP* en estas dos fuentes de carbono presentó un nivel similar de expresión, sin embargo, fue un tercio del alcanzado a las 12 h del cultivo en glucosa, y la mitad del obtenido en glicerol a las 12 h. El presente análisis mostró que tanto *LAC4* como *LAC12* están sobre-expresados en

la comparación SUSTRATO, es decir, a las 30 h de cultivo tienen mayor nivel de expresión en lactosa que en glucosa. Esto podría explicarse debido a que  $P_{GAP}$  pudo estar en condiciones de represión cuando se tomó la muestra del cultivo en glucosa, ya que a las 30 h de cultivo éste se encontraba en la fase estacionaria con bajos niveles de glucosa, mientras que a las 30 h de cultivo en lactosa, la glucosa proveniente de la hidrólisis de la lactosa pudo haber estado disponible a concentraciones muy bajas, y, como ya se mencionó anteriormente,  $P_{GAP}$  se regula positivamente por la presencia de la fuente de carbono. Sin embargo, en la comparación SUSTRATO no se encontró diferencia significativa entre los niveles del gen nativo *GAP*, a pesar de estar regulado por el mismo promotor que los genes heterólogos *LAC*.

Los niveles de expresión de *LAC4*, *LAC12* y *GAP* normalizados en FPKM no fueron similares entre éstos dentro del mismo transcriptoma evaluado, a pesar de estar regulados por  $P_{GAP}$ . Además, los niveles de transcritos de *GAP* no presentaron diferencia significativa en la comparación de los cultivos BMLac y BMGlc de KM71LAC412, mientras que los niveles de transcritos de *LAC4* y *LAC12* fueron mayores en el cultivo en BMLac. Esto sugiere mecanismos de regulación adicionales al control por  $P_{GAP}$ , los cuales pueden incluir cambios en la expresión de los genes heterólogos derivados de la inserción del casete de expresión en sitios aparentemente aleatorios del genoma, lo cual está reportado que puede afectar la expresión de los genes heterólogos (Schwarzshans et al. 2016). También podría influir en esta diferencia las regiones de la terminación de la transcripción, ya que la de *AOXI* es la que está presente en los genes heterólogos debido al plásmido empleado en la transformación de la cepa. Por último, está reportado que las alteraciones de  $P_{GAP}$  afectan el nivel de expresión de los genes que regulan. Un estudio (Qin et al. 2011) generó una biblioteca de  $P_{GAP}$  con distintas mutaciones, resultando en variantes que tenían de 0.006 a 19.6 veces la actividad del promotor nativo. Los  $P_{GAP}$  heterólogos de *LAC4* y *LAC12* difieren en la eliminación de un sitio de corte de *AvrII* en el  $P_{GAP}$  de *LAC4*, y en inserciones y deleciones cercanas al codón de inicio respecto al  $P_{GAP}$  nativo, con tres nucleótidos eliminados en el de *LAC4* y tres nucleótidos adicionales en el de *LAC12* alrededor de 20 pb *upstream* del codón de inicio (ver **Anexo 2**). Por lo tanto, es probable que las diferencias entre los promotores de *LAC4* y *LAC12* puedan ocasionar diferencias entre los niveles transcripcionales normalizados por FPKM.

Un artículo en donde se realizó evolución adaptativa de una cepa de *S. cerevisiae* modificada genéticamente con *LAC4* y *LAC12* para consumir lactosa (Guimarães et al. 2008b) menciona que se presentó una delección de 1593 pb en la región intergénica del plásmido aislada de la recombinante evolucionada que consumía lactosa con mayor eficiencia. Ya que la región entre los genes *LAC4* y *LAC12* presenta 4 sitios de unión para Gal4 (homólogo de Lac9 en *K. lactis*), en dicho estudio se llegó a la conclusión de que la delección alteró la arquitectura del promotor, dando lugar a una estructura favorable para la activación por Gal4 de *S. cerevisiae*. Los homólogos de *GAL4* en otros ascomicetos se unen a la secuencia consenso 5'-CGG(N<sub>11</sub>)CCG-3' (Choudhury y Whiteway 2018), por lo que es probable que el homólogo de *GAL4* en *P. pastoris* también lo haga. En el casete de pGAPZA-LAC412 existen 5 potenciales sitios de unión a *GAL4*, dos de estos ubicados cerca de las regiones 5' de *LAC4* y *LAC12*: uno a 222 pb del codón de inicio de *LAC12* y el otro a 216 pb del de *LAC4*. Es probable que esto pueda contribuir a la regulación de los genes heterólogos.

#### **8.2.3.6. Estado transcripcional del gen homólogo de un factor transcripcional activado por galactosa (*GAL4*) de *S. cerevisiae***

La proteína Gal4 en *S. cerevisiae* se encarga de la activación del regulón de galactosa cuando se induce por la presencia de galactosa (Johnston 1987), por lo que se buscaron homólogos del gen de este factor transcripcional en *P. pastoris*, ya que, en la cepa modificada para consumir lactosa, la galactosa no metabolizable se acumularía y podría influir en la activación de este factor. Se sabe que Gal4 en otros ascomicetos es un factor transcripcional y que su presencia no está correlacionada con el metabolismo de galactosa, por lo que se especula su función como un factor transcripcional general que se especializó en la regulación del metabolismo de galactosa o de glucosa en clados específicos, como en *S. cerevisiae* (Choudhury y Whiteway 2018).

La expresión de *GAL4* y *LAC9*, su homólogo en *K. lactis*, se regula negativamente por la presencia de glucosa, aunque por diferentes medios: en *GAL4* utiliza un represor (Gal80) y glucosa para disminuir el nivel transcripcional, mientras que *LAC9* tiene un nivel transcripcional basal bajo, que se autoinduce en presencia de lactosa cuando no hay glucosa en el medio (Zachariae y Breunig 1993). Dado que en *P. pastoris* no existe un

homólogo de la proteína represora Gal80, es más probable que se induzca por un mecanismo semejante al de *LAC9*.

El genoma de *P. pastoris* contiene un solo gen (*PpATT1*) que presenta un alto nivel de homología con el factor *GAL4* de *S. cerevisiae*, que está involucrado en la regulación del metabolismo de galactosa en *S. cerevisiae* (Jiang et al. 2015). Sin embargo, este gen en *P. pastoris* probablemente regule otros procesos celulares porque *P. pastoris* no puede metabolizar este carbohidrato debido a la pérdida de los genes del metabolismo de galactosa. Un estudio (Jiang et al. 2015) demostró que la delección de *PpATT1* permitió a cepas de *P. pastoris* mejorar sus niveles de tolerancia térmica, reducir defectos de lisis celular y hacerlas más robustas para bioprocesos.

Otro estudio (Ata et al. 2018) mostró que la sobre-expresión del factor de transcripción similar a *GAL4* provocaba que *P. pastoris* se comportara como una levadura Crabtree positiva, es decir, aumentaba su consumo de glucosa y producción de etanol, por lo cual denominaron a ese factor transcripcional como *CRA1*. En ese estudio, la sobre-expresión de *CRA1* ocasionó un aumento en los niveles transcripcionales de los genes de la glicólisis y los fermentativos, lo cual coincide con la comparación SUSTRATO del presente trabajo (que presentó una sobre-expresión de *GAL4* cuando KM71LAC412 se cultivó en lactosa respecto a glucosa). Los genes del ciclo de Krebs en el estudio previamente referido (Ata et al. 2018) no presentaron cambios en su expresión cuando se sobre-expresó *CRA1*, aunque se encontraron flujos metabólicos disminuidos en el ciclo de Krebs y en la vía de las pentosas fosfato, mientras que en la comparación SUSTRATO del presente trabajo se sub-expresaron los genes del ciclo de Krebs en lactosa (cuando el gen *PpATT1/CRA1* está sobre-expresado). En ese mismo estudio también encontraron un aumento en la captación de glucosa al sobre-expresar *CRA1*, sin embargo, los genes de los transportadores de glucosa no se encontraron sobre-expresados, por lo que la captación de glucosa se incrementó a causa del mayor flujo metabólico en la glicólisis y no por una mayor expresión de los genes de transportadores. En la comparación SUSTRATO, los transportadores se encontraron sub-expresados.

#### 8.2.4. Explicación del comportamiento de crecimiento en lactosa de *P. pastoris* KM71LAC412

Considerando los datos expuestos previamente, se plantea el siguiente mecanismo que correlacionaría la curva del crecimiento de KM71LAC412 en medio con lactosa y el comportamiento de la expresión de las secuencias heterólogas a lo largo del cultivo. Antes de obtener los resultados, se pensó que los genes *LAC* regulados por  $P_{GAP}$  se expresarían constitutivamente. Sin embargo, la expresión, y por lo tanto la funcionalidad de estos se pudo ver afectada de varias formas, que se expondrán a continuación y se resumen en la **Figura 102**. El metabolismo de lactosa, y por lo tanto el crecimiento de KM71LAC412 en lactosa estaría relacionado directamente con la regulación de los genes *LAC*.

1)  $P_{GAP}$ , a pesar de ser considerado como constitutivo, presenta diferencias en su expresión según la fuente de carbono y su concentración. En medio con bajas concentraciones de glucosa disminuye sus niveles de expresión. En el medio con lactosa, debido a que hay una menor disponibilidad de glucosa, la expresión de *LAC4* y *LAC12* puede estar disminuida. Además, la expresión de los genes heterólogos puede estar regulada por contribución de la actividad del promotor y participación de cambios estructurales en el genoma debido a las regiones en donde se integraron las secuencias heterólogas.

2) *P. pastoris* no metaboliza galactosa, y no se sabe cómo actúa la galactosa dentro de la célula. La galactosa podría tener varios destinos: a) ser expulsada de la célula por un transportador, como puede ser Lac12; b) ser un inhibidor competitivo tanto de la  $\beta$ -galactosidasa, como de la permeasa de lactosa (ya que también es un transportador de galactosa) y dificultar el crecimiento en lactosa; c) participar en la regulación celular por medio del homólogo de *GAL4*, ya que se sabe que este es un factor transcripcional que no solo regula los genes de metabolismo de galactosa en ciertos organismos (aunque estos genes no se encuentran en *P. pastoris*), sino que está presente en clados de ascomicetos que no metabolizan lactosa (Choudhury y Whiteway 2018).

3) Puede existir también una regulación post-traducciona de los genes *LAC*, como la inhibición de la  $\beta$ -galactosidasa por galactosa o glucosa; o la posible internalización de la permeasa de lactosa al cambiar a las células a un medio rico en lactosa (Rigamonte et al.





### 8.2.5. Resumen de resultados

La modificación de la cepa KM71 con las secuencias codificantes para *LAC4* y *LAC12* permitió el crecimiento de la cepa KM71LAC412 (KM71 modificada) en presencia de lactosa como única fuente de carbono y cambió su comportamiento metabólico. Se demostró que los genes *LAC* fueron funcionales, ya que creció y captó la lactosa del medio, sin embargo, los cultivos requirieron más tiempo para alcanzar la biomasa máxima. La velocidad de crecimiento de KM71LAC412 más baja cultivada en lactosa respecto a los cultivos en glucosa y glicerol pudo deberse a la velocidad de consumo de la lactosa, limitada por la disponibilidad de la glucosa después de la hidrólisis de la lactosa y el menor  $Y_{x/s}$  en comparación con glucosa pudo deberse a que no se usó toda la glucosa para generar biomasa, sino para el mantenimiento celular o en la conversión de energía liberada en forma de calor. No existe ningún reporte previo en la literatura de los resultados obtenidos en este estudio, porque los estudios en cepas productoras de  $\beta$ -galactosidasa de *P. pastoris* no tenían como propósito su crecimiento en lactosa. Las secuencias heterólogas no impactaron de manera negativa el crecimiento de KM71LAC412, como lo demostró la ausencia de diferencia significativa entre los rendimientos de KM71LAC412 y KM71pPIC9 cultivadas en la misma fuente de carbono: glucosa. Sin embargo, la presencia de los genes *LAC* ocasionó cambios en la expresión génica de otros los genes en la cepa KM71LAC412 en comparación con KM71pPIC9 cuando ambas se cultivaron en glucosa. Esto indica que la fuente de carbono aumentó el efecto de este cambio metabólico ocasionado por la introducción de los genes, ya que el mayor cambio en la expresión genética se observó durante el cultivo en lactosa de KM71LAC412, con alrededor de 40 % de los genes con expresión diferencial respecto a glucosa. Estos cambios en el crecimiento y la expresión aparentemente someten a la cepa KM71LAC412 a un estrés que tiene que equilibrar con energía de mantenimiento, por lo que en cultivos en lactosa no alcanza los mismos rendimientos por mol que los cultivos en glucosa, como se esperaría teóricamente. La sobre-expresión de genes de glicólisis/gluconeogénesis y la vía de las pentosas fosfato en lactosa respecto a glucosa confirmarían el cambio en el metabolismo central. Finalmente, es posible que la galactosa, subproducto de la hidrólisis de la lactosa y que *P. pastoris* no puede metabolizar, intervenga en el cambio de la regulación metabólica global.

### **8.3. OBJETIVO 2. Evaluación del comportamiento metabólico de las cepas KM71FTEII-LAC, KM71HGH22K-LAC y sus respectivas cepas control cultivadas en lactosa y otras fuentes de carbono y el efecto de estas fuentes de carbono sobre la regulación de los promotores *AOX1* y *GAP* mediante RT-qPCR.**

#### **8.3.1. Evaluación del efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y el rendimiento de biomasa por sustrato de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC**

Las cinéticas de crecimiento de las cepas se realizaron bajo la misma temperatura para todas las fuentes de carbono probadas. Se comenzaron las cinéticas a la misma densidad óptica inicial (0.1), excepto en las cinéticas en medio BMM, donde se empleó una densidad inicial de 1 para facilitar la cuantificación debido al crecimiento lento en metanol de estas cepas.

Las  $\mu$  estimadas para la cepa KM71FTEII-LAC en BMGlc y BMGly ( $0.261 \pm 0.034$  y  $0.251 \pm 0.048$  h<sup>-1</sup>, respectivamente) y para la cepa KM71HGH22K-LAC en BMGlc y BMGly ( $0.256 \pm 0.023$  y  $0.240 \pm 0.015$  h<sup>-1</sup>, respectivamente) fueron cercanas, aunque con valores más altos, a las reportadas previamente para cultivos en lote de *P. pastoris* en glicerol y glucosa:  $0.25 \pm 0.03$  h<sup>-1</sup> en glucosa y  $0.19 \pm 0.05$  h<sup>-1</sup> en glicerol (Geier et al. 2015), o  $0.19$  h<sup>-1</sup> en glucosa y  $0.26$  h<sup>-1</sup> en glicerol (Mattanovich et al. 2009). Sin embargo, como se mostró en dichos reportes, la  $\mu$  puede variar según la cepa y el medio de cultivo, e incluso se han reportado valores de  $\mu$  de  $0.16$  a  $0.28$  h<sup>-1</sup> para cepas de *P. pastoris* cultivadas en lote con exceso de glucosa (Looser et al. 2015). La velocidad específica de crecimiento de las cepas KM71FTEII-LAC, KM71HGH22K-LAC, KM71LAC412 y KM71pPIC9 en BMGlc y BMGly no presentó diferencias significativas ni entre cepas ni entre fuentes de carbono (ANOVA unifactorial,  $p \leq 0.05$ ), por lo que se puede concluir que la expresión de los genes *LAC* no ocasionó una carga metabólica, al no diferir significativamente la  $\mu$  de las cepas *LAC* con la de la cepa control.

Las  $\mu$  de KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC no presentaron diferencias significativas entre estas dos cepas en BMM, a pesar de que la  $\mu$  de KM71HGH22K-LAC fue ligeramente menor: la  $\mu$  de KM71FTEII-LAC en BMM fue de  $0.037 \pm 0.008$  h<sup>-1</sup>, y la  $\mu$  de KM71HGH22K-LAC en BMM fue de  $0.031 \pm 0.012$  h<sup>-1</sup>. Se ha reportado que las cepas Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* cultivadas en exceso de metanol tienen una  $\mu$  de  $0.011$  a

$0.035 \text{ h}^{-1}$  (Looser et al. 2015), por lo que estos valores se encuentran en el rango característico de las cepas Mut<sup>s</sup>.

El cálculo de las  $\mu$  de KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en BMLac también se realizó en dos fases, como en el caso de KM71LAC412: la primera abarcó las primeras 12 h de la cinética de crecimiento y comprendió el crecimiento que se pudo deber a restos intracelulares del medio de cultivo del inóculo, y la segunda, desde las 24 h hasta el inicio de la fase estacionaria, la cual fue variable entre las dos cepas (hasta las 78 h en KM71FTEII-LAC y hasta las 144 h en KM71HGH22K-LAC). Las  $\mu$  hasta las 12 h en los cultivos en BMLac de KM71FTEII-LAC ( $0.197 \pm 0.031 \text{ h}^{-1}$ ) y KM71HGH22K-LAC en BMLac ( $0.187 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$ ) no presentaron diferencia significativa entre sí ni con la correspondiente  $\mu$  de KM71LAC412 ( $0.162 \pm 0.035 \text{ h}^{-1}$ ), pero estas tres  $\mu$  fueron significativamente mayores a la correspondiente  $\mu$  de KM71pPIC9 ( $0.065 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$ ). Lo mismo ocurrió con la  $\mu$  calculada desde las 24 h hasta el inicio de la fase estacionaria: no se presentaron diferencias entre las  $\mu$  en BMLac de KM71FTEII-LAC ( $0.011 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$ ), KM71HGH22K-LAC ( $0.013 \pm 0.000 \text{ h}^{-1}$ ) y KM71LAC412 ( $0.012 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ ), y cada una de estas fue significativamente mayor que la de KM71pPIC9 ( $0.001 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$ ).

Las  $\mu$  de KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC en BMLacMet se calcularon en dos fases, de forma similar a las de BMLac. No se presentaron diferencias significativas entre las  $\mu$  de estas dos cepas en BMLacMet. La comparación entre las distintas fuentes de carbono indicó que la  $\mu$  en la fase de crecimiento exponencial de los cultivos en BMLacMet de cada cepa fue significativamente más baja que las de BMGlc y BMGly, y significativamente más alta que las de BMLac y BMM. Los cultivos en BMLacMet alcanzaron las densidades celulares más altas de todos los medios de cultivo empleados. Ya que el medio BMLacMet contiene una mezcla de dos sustratos distintos, es probable que la regulación de los genes que permitan su aprovechamiento sea compleja por la presencia de sustratos que reprimen o activan a dichos genes. Por ejemplo, la presencia de metanol y la presencia limitada de glucosa regularían a la baja la expresión de los genes regulados por  $P_{GAP}$ , que incluyen a los genes necesarios para el metabolismo de lactosa en las cepas LAC; y la presencia de glucosa proveniente de la lactosa podría regular a la baja la expresión del gen *AOX2*, requerido para metabolizar metanol.

El cálculo del rendimiento para las fuentes de carbono evaluadas se realizó con la  $X_{\max}$  obtenida en los mismos cultivos que se emplearon para determinar la  $\mu$  (excepto para BMM), a pesar de que el tiempo para alcanzar este parámetro haya sido variable. Los rendimientos en BMM empleados para la comparación con el resto de las fuentes de carbono se calcularon promediando los rendimientos de los cultivos de inducción en BMM a 30 °C (a las 24 y 48 h), debido a que los cultivos empleados para determinar la  $\mu$  (cinéticas de crecimiento) se detuvieron antes de alcanzar la  $X_{\max}$ . Las diferentes unidades en los cálculos de los rendimientos proporcionan información distinta, como se expuso en el apartado **8.2.2.1**, por ejemplo, el rendimiento por mol de sustrato y mol de carbono brinda la oportunidad para intentar explicar aspectos relacionados con el metabolismo de estos sustratos.

Los  $Y_{x/s}$  de KM71FTEII-LAC, KM71HGH22K-LAC, KM71LAC412 y KM71pPIC9 en BMGlc y BMGly, en cualquiera de los formatos calculados (por gramo, mol o mol de carbono de sustrato) no tuvieron diferencia significativa entre las cepas, sugiriendo la ausencia de carga metabólica debida a la expresión de los genes *LAC* al no haber diferencias con la cepa control ni entre las cepas LAC, algunas de las cuales tienen más copias de los genes *LAC*.

La fuente de carbono con mayor  $Y_{x/s}$  por gramo fue glicerol para KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC, pero la que contó con mayor  $Y_{x/s}$  por mol de sustrato fue glucosa. Algunos rendimientos reportados para cepas de *P. pastoris* en cultivo en lote con glicerol han sido 0.47 gDCW/g (Gmeiner et al. 2015), 0.43-0.72 gDCW/g (Looser et al. 2015) y 0.578-0.686 gDCW/g glicerol (Moser et al. 2017), por lo que los rendimientos en glicerol ( $0.422 \pm 0.070$  gDCW/g para KM71FTEII-LAC y  $0.428 \pm 0.006$  gDCW/g para KM71HGH22K-LAC) se encuentran dentro de los rangos reportados, tendiendo al límite inferior. En cuanto a los rendimientos en glucosa, se han reportado rendimientos de 0.559-0.584 gDCW/g (Rebnegger et al. 2016) y 0.37 gDCW/g a valores de  $\mu$  baja (Prielhofer et al. 2015). Los rendimientos en glucosa ( $0.362 \pm 0.008$  gDCW/g para KM71FTEII-LAC y  $0.326 \pm 0.002$  gDCW/g para KM71HGH22K-LAC) fueron cercanos a los de este último reporte. Los rendimientos similares con los resultados reportados en la literatura confirman la ausencia de carga metabólica debido a los genes *LAC*.

En general, no se presentó diferencia significativa entre los  $Y_{x/s}$  de las dos cepas (KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC) cuando se compararon en la misma fuente de carbono, excepto en el rendimiento por gramo en metanol, siendo mayor en KM71FTEII-LAC. El rendimiento en metanol no tuvo diferencia estadísticamente significativa entre ambas cepas cuando se calculó por mol de sustrato ni por mol de carbono (aunque este valor fue mayor en KM71FTEII-LAC). La diferencia en los rendimientos por gramo de metanol pudo deberse a que los análisis estadísticos consideraron todas las fuentes de carbono y el valor de los rendimientos cambió según la unidad del cálculo. Se debe considerar que en toda prueba estadística existe la posibilidad del error tipo I (falso positivo) y la probabilidad de este error aumentaría si se hicieran comparaciones pareadas, como una serie de pruebas t de Student (cada una con una probabilidad de error del 5 %), en vez de usar ANOVA y prueba de Tukey, donde se establece esa probabilidad de error para todas las comparaciones.

Los rendimientos por gramo de metanol ( $0.162 \pm 0.029$  gDCW/g para KM71FTEII-LAC y  $0.101 \pm 0.038$  gDCW/g para KM71HGH22K-LAC) fueron similares a los reportados para otras cepas de *P. pastoris*: 0.093-0.149 gDCW/g metanol para una cepa recombinante derivada de X-33 (Mut<sup>+</sup>) (Moser et al. 2017) y 0.15-0.42 gDCW/g metanol para varias cepas Mut<sup>+</sup> y Mut<sup>s</sup>, con 0.30 g/g reportados para una cepa Mut<sup>s</sup> (Looser et al. 2015).

Las dos cepas, KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC, crecieron en lactosa. El análisis estadístico de los  $Y_{x/s}$  en BMLac de las cepas KM71FTEII-LAC, KM71HGH22K-LAC, KM71LAC412 y KM71pPIC9, tanto por gramo, mol o mol de carbono, mostró que las tres cepas LAC tuvieron un rendimiento significativamente mayor al de la cepa control KM71pPIC9 que no contiene los genes *LAC*. Asimismo, KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC tuvieron rendimientos significativamente distintos entre sí en estos análisis estadísticos, sin embargo, ninguna de estas dos cepas difirió significativamente con los rendimientos alcanzados por KM71LAC412.

Los cultivos se realizaron bajo concentraciones equimolares de los diferentes sustratos y, debido a que por cada mol de lactosa se tiene un mol de glucosa, se esperaría obtener el mismo valor de  $Y_{x/s}$  en glucosa que en lactosa considerando una hidrólisis

completa de la lactosa. Sin embargo, los valores de  $Y_{x/s}$  por mol de sustrato en BMLac fueron significativamente más bajos con respecto a los de BMGlc para KM71LAC412 (62 % del  $Y_{x/s}$  en BMGlc) y KM71FTEII-LAC (54 % del  $Y_{x/s}$  en BMGlc) y casi sin diferencias para KM71HGH22K-LAC (93 % del  $Y_{x/s}$  en BMGlc). Estas diferencias sugieren una disponibilidad de la glucosa diferente entre las cepas, que podría deberse a una hidrólisis diferente de la lactosa por expresión diferencial de los genes *LAC*, o diferencias en la inhibición o degradación de la  $\beta$ -galactosidasa.

Los  $Y_{x/s}$  por mol de lactosa no tuvieron diferencia significativa con los de glicerol pero sí con los de glucosa en la cepa KM71FTEII-LAC, mientras que los  $Y_{x/s}$  por mol de lactosa no tuvieron diferencia significativa con los de glucosa pero sí con los de glicerol en la cepa KM71HGH22K-LAC. Esta diferencia en los rendimientos puede deberse a diferencias en el patrón de consumo de lactosa, generadas por la expresión de los genes *LAC*, ya sea por procesos de integración en el genoma distintos, o por diferencias en el número de copias integradas de los genes *LAC*, como se discutirá posteriormente. Esto se reflejaría en un mayor crecimiento en lactosa y actividades más altas de  $\beta$ -galactosidasa.

Considerar a la lactosa como fuente de carbono eficiente depende de los procesos en los que se empleen las cepas, sin embargo, se puede aseverar que sus rendimientos son equiparables a los rendimientos por mol de glucosa (en el caso de la cepa KM71HGH22K-LAC) o glicerol (en el caso de la cepa KM71FTEII-LAC), a pesar de que tarden más tiempo en alcanzar estos rendimientos. Por lo tanto, el uso de lactosa no es eficiente en cuanto al parámetro tiempo, pero puede serlo a nivel de rendimiento.

### **8.3.2. Efecto de la fuente de carbono en la expresión de genes regulados por el promotor *AOXI* en cultivos en metanol**

#### **8.3.2.1. Rendimientos de biomasa por sustrato y de proteína intracelular por biomasa**

Los  $Y_{x/s}$  en la fase de inducción con metanol no tuvieron diferencias significativas debidas a las fuentes de carbono de generación de biomasa, temperaturas o cepas evaluadas, excepto en casos específicos. Un ejemplo de esta diferencia es el rendimiento significativamente mayor en los cultivos cuya biomasa fue generada en BMLac respecto a BMG de la cepa KM71HGH22K-LAC cultivada a 24 °C a las 48 h. Sin embargo, se

puede concluir que no hay efecto de la fuente de generación de biomasa inicial en el  $Y_{x/s}$  en la fase de inducción.

A diferencia de la fase de inducción en metanol, los  $Y_{x/s}$  calculados al final de la fase de generación de biomasa en glicerol o lactosa (0 h de inducción) no pueden compararse entre las fuentes de carbono empleadas debido a que las densidades ópticas de inicio del cultivo de generación de biomasa fueron distintas y a que no se determinó si el sustrato del cultivo se consumió por completo porque los cultivos no se llevaron a la biomasa máxima. Debido a lo anterior, solamente es posible comparar las condiciones de cultivo (temperatura) dentro de la misma fuente de carbono. La temperatura de cultivo no provocó diferencias significativas entre los  $Y_{x/s}$  de la cepa KM71HGH22K-LAC en la fase de generación de biomasa. Sin embargo, para la cepa KM71FTEII-LAC, los  $Y_{x/s}$  en la fase de generación de biomasa fueron significativamente menores a 24 °C en comparación con 30 °C, tanto en BMG como en BMLac, por lo que esta cepa es afectada en mayor medida por la temperatura de cultivo.

El impacto de las condiciones de cultivo con los rendimientos de proteína intracelular (determinada por el método de Bradford) por biomasa es difícil de estimar debido a la variación obtenida en los datos, ocasionada por un mayor número de pasos de procesamiento de las muestras. No hubo diferencia de rendimientos de proteína intracelular por biomasa entre condiciones de cultivo ni cepas (al compararlas dentro del mismo tiempo muestral). A pesar de la ausencia de diferencia estadísticamente significativa, los rendimientos de proteína intracelular a las 24 h de la cepa KM71HGH22K-LAC fueron menores a los de KM71FTEII-LAC al compararlas bajo las mismas condiciones de cultivo; y a las 48 h los cultivos en BMLac presentaron un mayor rendimiento, aunque no estadísticamente significativo, que los de BMG en ambas cepas. No se encontró diferencia en el rendimiento entre los tres tiempos de muestreo en cada condición evaluada, el único caso donde se presentaron diferencias fue para la cepa KM71HGH22K-LAC cultivada a 30 °C, donde los rendimientos fueron significativamente menores a las 24 h que a las 0 o 48 h. Los puntos anteriores indican que los factores evaluados no tienen una influencia significativa sobre la producción de

proteína intracelular, aunque algunos factores tienden a incrementarla bajo ciertas condiciones, como se expuso previamente.

### **8.3.2.2. Actividad y rendimiento de $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa**

El rendimiento de  $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa no fue proporcional a los rendimientos de proteína intracelular por biomasa: se presentó una disminución significativa de las 0 a las 24 h en el rendimiento de  $\beta$ -galactosidasa por biomasa en la gran mayoría de las condiciones evaluadas y en ambas cepas, mientras que los rendimientos de proteínas intracelular por biomasa no variaron a lo largo del tiempo. El rendimiento de  $\beta$ -galactosidasa y el rendimiento biomasa/sustrato no presentaron una relación proporcional.

El rendimiento  $Y_{p/x}$  de  $\beta$ -galactosidasa (en U/mgDCW) se vio afectado por la fuente de carbono de generación de biomasa únicamente antes de la inducción con metanol (0 h) debido a que fue menor en los cultivos provenientes de BMLac comparados con los de BMG a las 0 h en KM71FTEII-LAC y en KM71HGH22K-LAC, lo cual se puede deber a inhibidores generados por el cultivo en BMLac, tales como galactosa, que estuvieran presentes en las muestras provenientes de BMLac o menores niveles de expresión de *LAC4* y *LAC12* debido a las condiciones limitantes de glucosa. A las 24 y 48 h de inducción no hubo diferencia de  $Y_{p/x}$  entre los cultivos provenientes de BMLac y BMG. Los  $Y_{p/x}$  disminuyeron a las 24 y 48 h de inducción en comparación con las 0 h, probablemente por una menor expresión del gen *LAC4*, evidenciada por el análisis de los niveles transcripcionales del gen *LAC4* a lo largo del cultivo. Este comportamiento es semejante al reportado para genes regulados por  $P_{GAP}$  en cultivos con metanol, disminuyendo su expresión en esta fuente de carbono (Waterham et al. 1997).

Existió diferencia significativa en los rendimientos de  $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa en todas las comparaciones entre las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC cuando se compararon los valores de cada cepa en la misma condición y al mismo tiempo de cultivo. El rendimientos de  $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa siempre fue mayor en KM71FTEII-LAC que en KM71HGH22K-LAC, debido posiblemente al número de copias del gen *LAC4* en KM71FTEII-LAC, lo cual fue confirmado en los análisis de RT-qPCR del gen *LAC4* en este estudio, en los que la



proporción de transcritos *LAC4/GAP* fue mayor en KM71FTEII-LAC. La clona de la cepa KM71FTEII-LAC empleada en este estudio poseía aproximadamente 25 copias del gen *LAC4*, según lo determinó un estudio del grupo de trabajo (Herrera-Estala 2015).

Los factores con mayor influencia sobre el rendimiento de  $\beta$ -galactosidasa fueron: la cepa, debido a la diferencia en el número de copias de *LAC4*; la fase de cultivo, por la disminución de la expresión de  $\beta$ -galactosidasa de las 0 a las 24 h de inducción; y la fuente de carbono, aunque este último factor solo influye durante la fase de generación de biomasa, siendo menor en BMLac posiblemente por inhibición por productos resultantes de la hidrólisis de lactosa, o por un a menor expresión del gen *LAC4* debido a la disminución de la expresión de este gen regulado por  $P_{GAP}$ .

### **8.3.2.3. Rendimientos de proteína extracelular por biomasa**

Los rendimientos de proteína extracelular por biomasa variaron entre las dos cepas: KM71FTEII-LAC obtuvo rendimientos 10 veces mayores en comparación con KM71HGH22K-LAC, a las 24 y 48 h de inducción. La condición de cultivo con el mayor rendimiento de proteínas extracelulares totales en ambas cepas fue en BMLac a 30 °C, la de menor rendimiento fue variable: BMLac a 24 °C para KM71FTEII-LAC y BMG a 30 °C para KM71HGH22K-LAC.

Al comparar las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC cada una con su respectiva cepa control sin los genes *LAC*, se observó que el rendimiento de proteína extracelular por biomasa respecto a la cepa control fue distinto para cada cepa LAC evaluada. La cepa control KM71FTEII en BMG a 30 °C tuvo un rendimiento significativamente mayor que cualquiera de las condiciones de cultivo de KM71FTEII-LAC tanto a las 24 como a las 48 h, y a 24 °C no existió diferencia significativa con algunas de las condiciones de cultivo de KM71FTEII-LAC, a los dos tiempos. La cepa control KM71HGH22K bajo ninguna condición de cultivo superó significativamente a la condición de mayor rendimiento de KM71HGH22K-LAC.

El tiempo de cultivo no afectó considerablemente los rendimientos de proteínas extracelulares totales en KM71FTEII-LAC en la fase de inducción, ya que no se presentó diferencia significativa en los rendimientos de proteínas extracelulares totales al comparar

los datos de las 24 h y 48 h de la misma condición, excepto en las condiciones BMG a 30 °C con CaCl<sub>2</sub> y BMLac a 30 °C sin CaCl<sub>2</sub>; en cambio, la cepa KM71FTEII presentó diferencia significativa entre las 24 y 48 h en ambas temperaturas de cultivo. De igual forma, el rendimiento de proteínas extracelulares totales en KM71HGH22K-LAC no presentó diferencia significativa entre las 24 y 48 h.

La fuente de carbono para generar biomasa, en general, no afectó los rendimientos de proteína extracelular total por unidad de biomasa en la fase de inducción en KM71FTEII-LAC, sin embargo, en KM71HGH22K-LAC durante la fase de inducción (tanto a 24 como a 48 h) se presentó un marcado impacto de la fuente de carbono en el cultivo a 30 °C, con rendimientos significativamente mayores en BMLac, y la fuente de carbono no provocó diferencias significativas en los rendimientos a 24 °C. Durante la fase de generación de biomasa (a las 0 h), en la cepa KM71HGH22K-LAC, el rendimiento de proteína extracelular total por unidad de biomasa fue mayor en BMLac que en BMG. El impacto de la fuente de carbono no se calculó a este tiempo para la cepa KM71FTEII-LAC.

#### **8.3.2.4. Rendimientos de proteína heteróloga regulada por P<sub>AOXI</sub>**

La comparación entre las dos cepas LAC que además producen una proteína heteróloga cuyo gen está regulado por P<sub>AOXI</sub> indicó que la fuente de carbono de generación de biomasa y las condiciones de cultivo en general tuvieron un efecto diferencial en ambas. Sin embargo, en las dos cepas LAC se observó que la generación de biomasa en cultivo con lactosa no afectó negativamente la producción de proteína recombinante regulada por P<sub>AOXI</sub>, al compararla con la generación de biomasa en glicerol, y que incluso el cultivo en lactosa dio lugar a la condición con mayor rendimiento de hGH en KM71HGH22K-LAC. Las diferencias entre los rendimientos de proteína heteróloga de las cepas LAC en comparación con sus cepas control se pueden explicar por la variación en los eventos de inserción de los plásmidos al momento de su transformación genética, ya que existe la posibilidad de que la manera en que estos se integran al genoma afecte la productividad de proteína heteróloga. Se ha descrito que *P. pastoris* puede integrar los casetes de expresión heterólogos de muchas formas, pudiendo integrarse en tándem en los sitios de recombinación homóloga esperados para el vector o en raras ocasiones integrarse

en otros puntos del genoma e interrumpir genes mediante procesos de recombinación no homóloga y afectar la productividad o la morfología de las colonias transformantes (Schwarzahns et al. 2016).

Otro aspecto para resaltar es la presencia de hGH y FTEII en sobrenadante antes de la inducción con metanol, siendo que los genes de estas proteínas heterólogas están regulados por  $P_{AOXI}$ . En un estudio se detectó la expresión de genes regulados por  $P_{AOXI}$  en fases de preinducción en células cultivadas en medio con glucosa o glicerol a nivel de biorreactor, por lo que se propuso que la productividad de los bioprocesos dependientes de  $P_{AOXI}$  no depende solamente de la inducción con metanol, y que las fases de preinducción deben ser optimizadas (Bawa et al. 2014).

La correlación entre los rendimientos de proteínas extracelulares totales y de proteína recombinante (FTEII o hGH) tendió a ser positiva, con un valor de  $R^2$  de 0.66 para las cepas productoras de FTEII y de 0.45 para las de hGH, considerando los datos obtenidos a las 24 y 48 h. Sin embargo, el rendimiento de proteína extracelular no necesariamente se vio reflejado en el rendimiento de FTEII, ya que al comparar ciertas condiciones de cultivo se observó que el rendimiento de proteínas extracelulares totales fue similar, mientras que el de FTEII fue significativamente distinto. El porcentaje de hGH en relación con proteína extracelular total no tuvo diferencias significativas a las 48 h a 24 °C entre las dos cepas productoras de hGH (KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K) cultivadas en BMG y KM71HGH22K-LAC cultivada en BMLac, es decir, no existió diferencia significativa entre estos tres datos.

El factor que más afectó el rendimiento de FTEII por unidad de biomasa de la cepa KM71FTEII-LAC fue la fuente de carbono para generar biomasa, los rendimientos fueron significativamente más altos en los cultivos que generaron biomasa en BMLac en comparación con BMG. El rendimiento de FTEII no se relacionó con el  $Y_{x/s}$  a las 24 y 48 h, ya que los rendimientos de FTEII variaron entre las condiciones de cultivo mientras que los de biomasa fueron constantes entre las condiciones.

La fuente de carbono inicial influyó sobre el rendimiento de hGH por unidad de biomasa, siendo significativamente mayor en los cultivos en BMLac a las 0, 24 y 48 h, aunque en este último tiempo solo fue significativamente mayor BMLac respecto a BMG

a 30 °C. Bajo condiciones de inducción (24 y 48 h), las condiciones con mayor rendimiento de proteína extracelular fueron las que obtuvieron mayor rendimiento de hGH.

En las dos cepas productoras de hGH (KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K) y todas las condiciones de cultivo evaluadas en este estudio, la concentración de hGH en sobrenadante a las 48 h de inducción se encontró comprendida entre los rangos de 1.724 a 11.863 µg/mL, con una densidad celular de 8.56 a 12.33 gDCW/L. En un estudio previo (Ecamilla-Treviño et al. 2000), que empleó una cepa de *P. pastoris* GS115 productora de hGH producida previamente en el grupo de trabajo, se reportó una concentración de hGH en sobrenadante de 3 a 11 µg/mL en cultivos a 30 °C con glicerol como fuente de carbono inicial y con densidad celular de 10 gDCW/L, por lo que fue similar a lo obtenido en el presente trabajo.

En el grupo de trabajo se había realizado previamente una evaluación de la producción de hGH de la cepa KM71HGH22K-LAC a 30 °C empleando BMG y BMLac para generar biomasa. Una diferencia del presente estudio con el cultivo del trabajo anterior (Balderas-Cisneros 2016) consistió en el tiempo de generación de biomasa y la DO<sub>600 nm</sub> inicial. Mientras que en este trabajo se empleó una DO<sub>600 nm</sub> inicial de 0.5 para el cultivo en BMLac y un tiempo de cultivo aproximado de 11 h, en el trabajo previo se empleó una DO<sub>600 nm</sub> inicial de 0.3 y los cultivos se dejaron creciendo hasta alcanzar una DO<sub>600 nm</sub> mayor a 6, lo cual tomó alrededor de 30 h de cultivo. Debido al largo tiempo de cultivo, en este estudio se optó por emplear un inóculo mayor al momento del cultivo en BMLac para la generación de biomasa. Sin embargo, los rendimientos de proteínas extracelulares por unidad de biomasa en la fase de inducción fueron similares entre dicho estudio (Balderas-Cisneros 2016) y el presente trabajo. El rendimiento de proteínas extracelulares por unidad de biomasa calculado en la evaluación previa de la cepa KM71HGH22K-LAC fue de 25.1 mg/gDCW en BMG y 34.5 mg/gDCW en BMLac, y el de la cepa control fue de 22.1 mg/gDCW en BMG. En el presente estudio, el rendimiento de proteínas extracelulares por unidad de biomasa de la cepa KM71HGH22K-LAC fue de 20.43 ± 1.53 mg/gDCW en BMG y 34.29 ± 5.52 mg/gDCW en BMLac, y el de la cepa control fue de 17.88 ± 0.87 mg/gDCW en BMG, por lo tanto, los rendimientos de proteína

extracelular por biomasa fueron similares para KM71HGH22K-LAC cultivada en BMLac inicial.

La concentración de hGH en sobrenadante de la cepa control KM71HGH22K resultó ser similar entre los dos estudios (91 % en este estudio relativo al estudio previo (Balderas-Cisneros 2016)). Sin embargo, este parámetro fue diferente en la cepa KM71HGH22K-LAC, ya que en el presente estudio en BMG inicial a 30 °C se obtuvo el 28.73 %, y en BMLac el 355.20 % de la concentración de hGH reportada en el estudio previo (Balderas-Cisneros 2016) en la respectiva condición. En el presente estudio se obtuvieron concentraciones de hGH en sobrenadante (determinadas por ELISA) de  $1724.12 \pm 125.07$  ng/mL en BMG inicial y  $11863.59 \pm 1827.77$  ng/mL en BMLac inicial a las 48 h, para la cepa KM71HGH22K-LAC cultivada a 30 °C. El porcentaje de hGH relativo a las proteínas extracelulares totales siempre fue menor en el presente estudio relativo al anterior, ya que en el estudio previo (Balderas-Cisneros 2016) el menor porcentaje, que fue 9.0 %, lo obtuvo la cepa KM71HGH22K-LAC cultivada en BMLac inicial, mientras que en este estudio, la misma cepa en la misma condición obtuvo 4.17 %, siendo el porcentaje más alto de las condiciones de cultivo evaluadas en el presente trabajo. Esto quiere decir que el porcentaje de hGH relativo a las proteínas extracelulares totales más bajo del estudio previo resultó ser más alto que el porcentaje más alto obtenido en el presente trabajo. La razón de estas diferencias no es clara, pero se debe considerar que la fase de generación de biomasa en BMLac difirió en ambos estudios. Sin embargo, el procedimiento de generación de biomasa en BMG fue igual, y los rendimientos de proteína extracelular por biomasa fueron similares, sin embargo, los rendimientos de hGH por biomasa fueron diferentes. Por lo tanto, tanto la forma de cultivar las células en BMLac como la técnica de determinación de la concentración de hGH pudieron haber causado estas diferencias.

Los resultados encontrados en este trabajo muestran que cada cepa LAC tuvo un comportamiento distinto respecto a su cepa control y a las condiciones de cultivo. Sin embargo, se puede concluir que en ambas cepas LAC, el cultivo con lactosa para generación de biomasa no tuvo un efecto nocivo en la expresión del gen regulado por

$P_{AOXI}$ , e incluso fue beneficioso en ciertos casos en donde el rendimiento fue más alto en esta fuente de carbono, como en el cultivo de la cepa KM71HGH22K-LAC.

### **8.3.3. Análisis por RT-qPCR**

#### **8.3.3.1. Genes normalizadores**

Los niveles de expresión de los dos genes normalizadores, *G6PD* y *YPT1*, fueron constantes y prácticamente iguales a los de la muestra calibradora bajo todas las condiciones evaluadas para las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC. Para esta última, algunas condiciones presentaron niveles de *G6PD* inferiores a los de la muestra calibradora (~0.8) y niveles de *YPT1* superiores a los de la muestra calibradora (~1.25). En general, la expresión de los genes normalizadores fue constante e independiente de las condiciones de temperatura, fuente de carbono inicial y tiempo de inducción. Este resultado concuerda con lo esperado, debido a que ambos genes ya se han empleado como genes normalizadores en estudios previos del grupo de trabajo (Félix-Castro 2013).

#### **8.3.3.2. Genes regulados por el promotor *GAP***

La expresión de los genes regulados por el promotor *GAP*, tanto el gen endógeno *GAP* como el gen heterólogo *LAC4*, después de la inducción con metanol (24 y 48 h de inducción) fue menor que la de la muestra calibradora (0 h de inducción) en las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC, por lo tanto, la expresión de los genes regulados por el promotor *GAP* se reprimió en presencia de metanol sin importar la cepa, fuente de carbono inicial o temperatura de cultivo. La disminución de la expresión de genes regulados por el promotor *GAP* en *P. pastoris* cultivada en medio con metanol ya ha sido reportada previamente (Waterham et al. 1997). Desde el aislamiento del promotor *GAP*, se ha observado que la expresión de genes regulados por éste es menor en cultivos con metanol en comparación con cultivos en glucosa (~36 % de la expresión) o glicerol (~50 % de la expresión) y, en general, los niveles de expresión son más cercanos entre metanol y glicerol que entre metanol y glucosa, ya que el promotor *GAP* presenta mayor actividad en glucosa (Waterham et al. 1997). En un estudio reciente se encontró que, a las 24 h de cultivo, los niveles del gen *GAP* fueron cuatro veces menores en medio con

metanol en comparación con medio con glucosa en exceso, y no se encontró diferencia en la expresión entre los cultivos en glucosa en exceso y glicerol, o entre glucosa en exceso y limitada (Prielhofer et al. 2015).

La regulación de *GAP* por el promotor *GAP* fue similar en las dos cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC, presentándose en ambas una represión en metanol. El mayor nivel de expresión a las 0 h en la cepa KM71FTEII-LAC lo presentó la condición de cultivo a 24 °C en BMLac inicial, mientras que en la cepa KM71HGH22K-LAC la mayor expresión se obtuvo en los cultivos con BMG inicial, a 30 y 24 °C. La diferencia en la condición de mayor expresión puede deberse a la combinación de varios factores propios de las cepas, entre los que se incluiría que los sitios de integración de los genes heterólogos que poseen modificaran la expresión genética de regiones cercanas. La disminución relativa de las 0 a las 24 h de inducción fue mayor en la condición de BMG inicial a 30 °C para ambas cepas *LAC*, disminuyendo entre 10-12 veces al cambiar a medio con metanol.

La expresión del gen *LAC4*, regulada también por el promotor *GAP*, mostró represión en metanol en las dos cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC. La condición de cultivo con mayor expresión de *LAC4* a las 0 h en la cepa KM71FTEII-LAC fue a 24 °C en BMLac inicial, y en la cepa KM71HGH22K-LAC, la mayor expresión se obtuvo a 30 °C en BMG inicial. Estos resultados son similares a los obtenidos para el gen *GAP*. Sin embargo, la proporción en la que la expresión de *LAC4* disminuyó de las 0 h a las 24 h fue distinta a la del gen *GAP*. La condición con mayor disminución de la expresión de *LAC4* en la cepa KM71FTEII-LAC fue a 24 °C en BMLac inicial, disminuyendo cerca de 16 veces, mientras que en el resto de las condiciones de cultivo la disminución fue menor a 5 veces. En la cepa KM71HGH22K-LAC la menor disminución de la expresión de *LAC4* la tuvo la condición a 30 °C en BMG inicial, lo cual concuerda con los resultados del gen *GAP*.

Si los promotores *GAP* que regulan a los genes *GAP* y *LAC4* tuvieran el mismo comportamiento, la proporción *GAP/LAC4* debería ser la misma a todos los tiempos y condiciones de inducción. Sin embargo, la proporción de *GAP/LAC4* en la cepa KM71HGH22K-LAC presentó variación entre las condiciones de cultivo. En la cepa

KM71FTEII-LAC, la proporción fue similar entre las cuatro condiciones de cultivo. En un estudio previo del grupo de trabajo (Herrera-Estala 2015) se determinó el número de copias de la clona de KM71FTEII-LAC empleada para los análisis del presente trabajo. El estudio de esta clona indicó que cuenta con ~25 copias del gen *LAC4*. Por lo tanto, se esperaría que la proporción entre los niveles transcripcionales absolutos de *GAP/LAC4* fuera 1/25 al estar regulados por el mismo promotor, es decir, debería ser cercana a 0.04 en KM71FTEII-LAC, ya que solo existe una copia del gen *GAP*. Sin embargo, esta proporción fue muy distinta del valor esperado, ya que mostró valores superiores a 10, lo que indica mayor cantidad de transcritos de *GAP* que de *LAC4* a pesar de que este último tiene un mayor número de copias en el DNA. Entre las posibles causas de que la cantidad de transcritos de *LAC4* sea menor que la de *GAP* se pueden considerar una mayor actividad del promotor *GAP* nativo, o que las regiones cercanas a las posiciones del genoma en las que se insertó el vector de expresión con los genes *LAC*, o incluso la misma secuencia del gen, contribuyan a su regulación. También, la región terminadora es distinta en ambos genes, ya que *GAP* tiene su terminador nativo, mientras que *LAC4* posee el terminador de *AOXI*, lo cual puede afectar su vida media ya que se ha reportado que la región 3'UTR, de la cual el terminador forma parte, está involucrada en la estabilidad del RNA (Tuller et al. 2009). En conclusión, la evidencia indica que la regulación de la transcripción de estos genes no depende únicamente del promotor *GAP*, lo cual ya se había observado previamente en el presente estudio en los resultados del análisis del transcriptoma de la cepa KM71LAC412.

Los resultados de la expresión de *LAC4* y de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa permitirían inferir que hay una relación directa entre la represión de la transcripción en los cultivos en metanol y los niveles de actividad por unidad de biomasa de  $\beta$ -galactosidasa para ambas cepas. Sin embargo, aunque los niveles relativos de transcritos no tienen una correlación proporcional con los niveles de producción de  $\beta$ -galactosidasa, éstos manifiestan tendencias similares.

Con los experimentos realizados no es posible asegurar si los niveles del transcrito *LAC4* se correlacionan con la cantidad de  $\beta$ -galactosidasa producida, ya que no se cuantificó la cantidad absoluta de proteína sino la actividad de la enzima. La actividad



enzimática de  $\beta$ -galactosidasa puede disminuir en presencia de glucosa y/o galactosa, carbohidratos resultantes de la hidrólisis de la lactosa que pueden estar presentes en los lisados de las células crecidas en BMLac. A pesar de lo anterior, se observó en general una disminución de los niveles de actividad de  $\beta$ -galactosidasa y transcrito *LAC4* al pasar del cultivo de generación de biomasa al cultivo de inducción con metanol.

### **8.3.3.3. Genes regulados por el promotor *AOX1* y genes de la vía de utilización del metanol**

No existió correlación entre los niveles de transcritos regulados por  $P_{AOX1}$  y la cantidad de proteína producida por biomasa. En el caso de *FTEII*, la cantidad de unidades de FTEII producidas por biomasa fue mayor para KM71FTEII (control) que para KM71FTEII-LAC a las dos temperaturas de cultivo durante la fase de inducción, a pesar de que los niveles de transcritos de *FTEII* en la cepa control a 30 °C no fueron mayores a los de KM71FTEII-LAC a las 24 h, e incluso los niveles más bajos del transcrito a este tiempo los obtuvo la cepa control a 30 °C. En el caso de *HGH*, la condición de mayor producción de hGH, que fue de KM71HGH22K-LAC a 30 °C en BMLac inicial, resultó tener un nivel menor de transcritos que el resto de las condiciones a ese tiempo, por lo tanto, los niveles altos de producción no son dependientes de la regulación a nivel transcripcional, sino que se regulan a nivel post-transcripcional o traduccional.

La regulación de la expresión de *FTEII*, *aox1::ARG4*, *AOX2* y *DAS* en los cultivos inducidos con metanol fue dependiente de la fuente de carbono, la temperatura del cultivo que generó la biomasa y de la cepa evaluada. Así, los cultivos a 24 °C en BMG inicial de la cepa KM71FTEII-LAC fueron los que presentaron los niveles de transcripción más bajos en comparación con las otras condiciones de cultivo. El incremento en el nivel de transcripción respecto al tiempo 0 h fue más alto en los genes *AOX2* y *DAS* que en los regulados por el promotor de *AOX1*.

La cuantificación absoluta mostró que los niveles del gen *aox1::ARG4* fueron por lo general mayores que los del gen *AOX2*, lo cual coincide con el reporte que indica que los niveles de *AOX2* son más bajos que los de *AOX1* en células crecidas en metanol (Cregg et al. 1989). En general, el perfil de la actividad transcripcional de los genes implicados en el metabolismo del metanol fue similar entre los diferentes genes evaluados en cultivos

crecidos en metanol, presentando su nivel máximo a las 24 h. En las cepas con el gen *HGH*, los perfiles transcripcionales de *HGH*, *AOX1*, *AOX2* y *DAS* fueron diferentes y dependientes de las condiciones de cultivo empleadas para la generación de biomasa, presentando un máximo a las 24 h. Los niveles transcripcionales más altos los presentó *DAS*, seguido de *AOX2*, lo cual concuerda con los resultados de las cepas que poseen el gen *FTEII*.

El bajo nivel transcripcional a las 0 h de los genes regulados por el promotor de *AOX1* (*FTEII*, *HGH* y *aox1::ARG4*) se debe a que el promotor de *AOX1* se reprime en presencia de glucosa o glicerol, aun en presencia de metanol (Hartner y Glieder 2006). Un estudio mostró que la transcripción del gen *AOX1* aumenta aproximadamente 128 veces en medio con metanol comparado con medio con glucosa en exceso a las 24 h (Prielhofer et al. 2015). Los resultados de los niveles de transcripción del gen *aox1::ARG4* mostraron que el aumento de los niveles transcripcionales de las 0 a las 24 h de inducción fue variable entre las condiciones de cultivo probadas, ya que en la cepa KM71FTEII-LAC alcanzó un aumento máximo de 60 veces a las 24 h respecto a las 0 h en la condición de BMLac a 30 °C, mientras que en la condición de cultivo a 24 °C en BMG inicial de KM71FTEII-LAC ocurrió lo contrario, siendo mayor el nivel transcripcional a las 0 h que a las 24 h. Los niveles transcripcionales del gen *FTEII* en la condición de cultivo a 24 °C en BMG inicial tuvieron un aumento de 10 veces de las 0 a las 24 h, al contrario que en la misma condición para el gen *aox1::ARG4*, en donde disminuyeron. A pesar de que únicamente se contó con un replicado de esta condición para 0 h y otro para 24 h, dado que los niveles transcripcionales de los dos genes normalizadores se mantuvieron constantes a estos dos tiempos, este resultado es válido. En estudios previos del grupo de trabajo (Félix-Castro 2013), el aumento de la expresión del gen *FTEII* a las 24 h de inducción fue de ~25 veces en dos condiciones de cultivo distintas en las que se empleó BMG como fuente de carbono inicial..

A diferencia de KM71FTEII-LAC, la cepa KM71HGH22K-LAC sí alcanzó el aumento de los niveles transcripcionales de *aox1::ARG4* de las 0 a las 24 h de más de 100 veces que se había reportado previamente en otro estudio (Prielhofer et al. 2015), aunque solamente obtuvo estos niveles en la condición de cultivo a 30 °C en BMLac inicial. Las

condiciones restantes mostraron un aumento de ~10 veces. El incremento de los niveles del gen *HGH* fue similar al del gen *aox1::ARG4*, excepto en la condición de cultivo a 30 °C en BMLac inicial, en la que el aumento fue solamente de ~3.

De manera similar al análisis de  $P_{GAP}$ , la proporción entre los niveles de transcritos del gen *aox1::ARG4* y *FTEII* o *HGH* debería ser siempre la misma en todos los tiempos y condiciones de cultivo para la misma cepa, si es que  $P_{AOXI}$  regula a estos genes de la misma manera. Sin embargo, los resultados mostraron proporciones *aox1::ARG4/FTEII* o *aox1::ARG4/HGH* distintas entre las cepas y tiempos de cultivo, con un valor menor de esta proporción en KM71HGH22K-LAC que en KM71FTEII-LAC. Esto indica que el nivel de expresión de los genes no depende únicamente de la actividad de  $P_{AOXI}$ , y puede tener otras causas como las propuestas en el análisis de  $P_{GAP}$ , por ejemplo, que las regiones cercanas a los sitios de inserción de los genes heterólogos contribuyan a una modificación de la regulación de la expresión de  $P_{AOXI}$  heterólogo respecto al nativo.

Los resultados de un estudio previo del grupo de trabajo (Félix-Castro 2013) mostraron que la transcripción de *AOX2* aumentó alrededor de 6 a 8 veces en la fase de inducción entre las 22 y las 30 h respecto a las 0 h de inducción en dos condiciones de cultivo con glicerol como fuente de carbono inicial, es decir aumentó 6-8 veces en metanol respecto a glicerol. En otro estudio (Prielhofer et al. 2015), la transcripción de *AOX2* aumentó cerca de 128 veces a las 24 h en las condiciones de cultivo a 25 °C en metanol y en glucosa limitada comparadas con el exceso de glucosa. En el mismo estudio, el aumento en la transcripción de los genes *DAS* (*DAS1* y *DAS2*) fue de ~512 veces en metanol y ~32 veces en glucosa limitada respecto a glucosa en exceso o glicerol en exceso. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron un aumento en la expresión de los genes *DAS* de las 0 a las 24 h de inducción superior a 100 veces en la cepa KM71FTEII-LAC en todas las condiciones de cultivo probadas, excepto a 24 °C en BMG inicial. En la cepa KM71HGH22K-LAC, también hubo un aumento en la expresión de los genes *DAS* superior a 100 veces de las 0 a las 24 h en la condición de cultivo a 30 °C. En ambas cepas, la condición de cultivo con el menor aumento de la transcripción de *DAS* de las 0 a las 24 h resultó ser el cultivo a 24 °C en BMG inicial. La transcripción de *AOX2* de las 0 a las 24 h aumentó ~40-50 veces en la cepa KM71FTEII-LAC en las condiciones

de cultivo a 30 °C, 10 veces en el cultivo a 24 °C en BMG inicial y más de 100 veces a 24 °C en BMLac inicial.

Los genes que codifican para la hidroxiacetona sintasa (*DAS*) se inducen con metanol y se reprimen con glucosa (Hartner y Glieder 2006). A las 24 h de inducción con metanol, la cepa KM71FTEII-LAC presentó este comportamiento, con mayor expresión de *DAS* en metanol respecto a la fuente de carbono de generación de biomasa. Sin embargo, la cepa KM71HGH22K-LAC cultivada en BMG inicial a 24 °C tuvo el mismo nivel transcripcional tanto a las 0 como a las 24 horas de inducción, el cual fue el más alto de las 4 condiciones de cultivo a las 0 h y el más bajo a las 24 h. En esta condición y cepa se procesaron dos replicados a las 0 h y uno a las 24 h, y los niveles de los genes normalizadores se mantuvieron constantes, proporcionando confiabilidad a los resultados.

#### **8.3.4. Resumen de resultados**

Se evaluó el efecto de la fuente de carbono (glicerol y lactosa) y la temperatura empleadas en la generación de biomasa sobre la expresión de genes inducidos por metanol en las cepas KM71FTEII-LAC y KM71HGH22K-LAC, así como en las cepas control sin los genes *LAC*. Se estudió la actividad transcripcional de los genes regulados por los promotores *AOX1* y *GAP*, de dos genes normalizadores y de los genes *AOX2* y *DAS*, y se determinaron los niveles de transcripción relativa frente una muestra calibradora, la cual se obtuvo del cultivo en BMG a 30 °C previo a la etapa de inducción para cada cepa evaluada. La actividad transcripcional se evaluó en cultivos que generaron biomasa en BMG y en BMLac a 24 y 30 °C a los tiempos 0 h (antes de la inducción con metanol y después de agotar la fuente de carbono para la generación de biomasa) y a las 24 y 48 h de inducción con metanol. Además, se evaluaron los niveles de producción de hGH, FTEII y  $\beta$ -galactosidasa.

Los resultados mostraron que los genes normalizadores presentaron una actividad transcripcional constante independiente de las condiciones de cultivo, lo cual asegura su empleo como genes normalizadores. La actividad transcripcional de *GAP* y *LAC4* estuvo presente al tiempo 0 h, con variaciones dependientes de las condiciones en la que se generó la biomasa. La actividad transcripcional de *GAP* y *LAC4* disminuyó en los cultivos con metanol a las 24 y 48 h de inducción. Dicha actividad transcripcional de *LAC4* se

correlacionó con el decremento en la actividad de  $\beta$ -galactosidasa por unidad de biomasa en la etapa de inducción con metanol.

La actividad transcripcional de *FTEII*, *HGH*, *aox1::ARG4*, *AOX2* y *DAS* estuvo presente en el cultivo con metanol, con un pico a las 24 h, mostrando niveles y perfiles de expresión dependientes de la cepa y las condiciones de cultivo empleadas para la generación de biomasa. El incremento en los niveles de transcripción en la etapa de inducción comparada con la de generación de biomasa de los genes *AOX2* y *DAS* por lo general fue mayor al presentado por *aox1::ARG4* y el gen heterólogo, y dependió de las condiciones empleadas para generar la biomasa y de la cepa.

Los niveles de expresión de los genes heterólogos *FTEII* y *HGH* no mostraron una correlación con los niveles de producción en todos los casos. El comportamiento de cada cepa en cuanto su perfil transcripcional y niveles de producción de la proteína heteróloga fue determinado por las condiciones de cultivo en la que se generó la biomasa, por el gen heterólogo a expresarse, la proteína heteróloga producida y probablemente los eventos de integración de los genes heterólogos en el genoma ocurridos.

La hipótesis de trabajo, según los resultados obtenidos, quedó confirmada, aunque a nivel de producto proteico final. El empleo de lactosa como fuente de carbono y generación de biomasa por parte de cepas de *P. pastoris* modificadas genéticamente para expresar genes de forma constitutiva que permitan emplear la lactosa, aunado a las condiciones de cultivo, afectó de forma diferencial los niveles de expresión de genes heterólogos regulados por el promotor *AOX1* a nivel de expresión de producto proteico pero no a nivel transcripcional.

Los resultados demostraron que la lactosa puede ser una opción como fuente de carbono para la producción de proteínas recombinantes, sin embargo, su eficiencia estará determinada por múltiples factores que impactan a nivel de la transcripción y en procesos postranscripcionales. El desarrollo de este trabajo aportó conocimiento nuevo sobre procesos celulares que impactan en la eficiencia de la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* y en la posibilidad del empleo de la lactosa como fuente de carbono empleando el metanol como inductor de la expresión de genes heterólogos.

### **8.4. OBJETIVO 3. Construcción de una cepa de *P. pastoris* productora de una $\beta$ -galactosidasa extracelular**

#### **8.4.1. Recapitulación y posibles causas del fallo de los intentos de construcción**

Se realizaron tres intentos de construcción de una cepa de *P. pastoris* capaz de producir  $\beta$ -galactosidasa extracelular a partir de un gen sintético codificante para  $\beta$ -galactosidasa de un hongo del género *Paecilomyces*, en los cuales no se obtuvieron los resultados esperados. A continuación, se tratarán de recapitular los resultados y las posibles explicaciones para los fallos de los intentos de la construcción de *P. pastoris* productora de  $\beta$ -galactosidasa extracelular.

En el primer intento, se aisló el plásmido pCC1-b-GalgsE de la cepa de *E. coli* EPI300 proporcionada por la compañía a la que se encargó la síntesis de la secuencia (GenScript), tras cultivarla según las instrucciones de manejo. Con el plásmido pCC1-b-GalgsE obtenido se transformó la cepa de *E. coli* TOP10, a partir de la cual se extrajo el plásmido que se empleó para obtener el inserto b-Galgs. La obtención del inserto b-Galgs se realizó tres veces debido a que en el primer intento, los rendimientos del inserto fueron bajos y la ligación fue inhibida, y en el segundo intento se degradó el inserto al momento de la purificación. Hasta el tercer intento se logró purificar el inserto que se usó en la primera construcción del plásmido. En todas estas ocasiones el tamaño del inserto b-Galgs purificado no se logró determinar con precisión por el uso de pre-tinción en las electroforesis en gel de agarosa, sin embargo, se asumió que el inserto presentaba la secuencia correcta porque se liberó del vector con las enzimas de restricción XhoI y NotI y presentó un tamaño similar al teórico.

Los plásmidos pGAHbGalgs derivados de la primera construcción se caracterizaron por PCR con oligonucleótidos dirigidos al promotor y a una región interna de la secuencia del inserto, para confirmar la ligación del vector pGAH con el inserto b-Galgs. Debido a que estos plásmidos presentaron un producto amplificado en un tamaño similar al esperado, se asumió que la construcción del plásmido se había llevado a cabo correctamente, por lo tanto, el plásmido pGAHbGalgs se empleó para la modificación genética de *P. pastoris* KM71. Las cepas de *P. pastoris* KM71bGalgs resultantes se caracterizaron por PCR con los oligonucleótidos ya mencionados, resultando en un

tamaño similar al esperado. Sin embargo, a pesar de que la secuencia del gen sintético estuviera presente según las caracterizaciones por PCR, la caracterización fenotípica de las levaduras modificadas genéticamente no mostró actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Análisis de restricción posteriores de los plásmidos de la primera construcción demostraron que el plásmido pCC1-b-Galgs derivado de la cepa de *E. coli* EPI300 enviada por GenScript presentaba una posible mutación del gen b-Galgs por inserción, *downstream* de la región amplificada en la caracterización por PCR, por lo que no se detectó previamente por PCR. Por lo tanto, es probable que el producto proteico del gen perdiera la actividad de  $\beta$ -galactosidasa debido a esta mutación.

Se realizó un segundo intento de construcción del plásmido pGAHbGalgs empleando el plásmido liofilizado pCC1-b-GalgsL para transformar una cepa de *E. coli* TOP10 con el fin de propagarlo, ya que el plásmido contaba con la secuencia correcta de acuerdo con los análisis de calidad enviados por la compañía. La cepa transformada se usó para generar una cantidad suficiente de plásmido para purificar el inserto b-Galgs. El inserto sufrió degradación al momento de la purificación, sin embargo, se intentó ligar este inserto con el vector, ya que en ese momento no se contaba con más enzima NotI para reacciones de restricción preparativa adicionales. Después de realizar las ligaciones y transformaciones, se obtuvieron colonias en las placas, indicando que fueron transformadas con un plásmido que permitió expresar el marcador de selección de resistencia a ampicilina. Este plásmido pudo haber sido el plásmido pGAHbGalgs, otros productos de ligación, o incluso plásmido pGAHFTEII que no pudo separarse en la purificación del vector pGAH. La caracterización por PCR mostró que solamente una de las colonias analizadas contenía el plásmido pGAHbGalgs, este bajo número se esperaba debido a la baja calidad del inserto b-Galgs empleado para la ligación.

La transformación de *P. pastoris* KM71 con el plásmido pGAHbGalgs obtenido en el segundo intento de construcción resultó en la obtención de un mayor número de colonias transformantes comparado con el primer intento debido a que las células electrocompetentes de *P. pastoris* KM71 utilizadas se prepararon el día anterior a la electroporación, mientras que en la primera transformación se encontraban almacenadas a -70 °C. La caracterización por PCR de dos clonas de *P. pastoris* KM71 transformadas

con pGAHbGalgs mostró que solo una contenía la secuencia esperada. La caracterización fenotípica mediante crecimiento en placa con X-gal de 60 clonas de esta misma transformación resultó negativa, mientras que las cepas de *P. pastoris* con actividad intracelular de  $\beta$ -galactosidasa empleadas como controles positivos mostraron la coloración azul que indicaría la actividad de la enzima.

Debido a que no se presentó actividad de  $\beta$ -galactosidasa en ninguna de las dos transformaciones de *P. pastoris* KM71 con el plásmido pGAHbGalgs, se realizaron caracterizaciones de los plásmidos pCC1-b-Galgs y pGAHbGalgs mediante análisis de restricción con varias combinaciones de enzimas. La caracterización del plásmido pCC1-b-Galgs proveniente de *E. coli* EPI300 y de los plásmidos pGAHbGalgs, demostró que la región entre los sitios XhoI y BglII interno de la secuencia sintética codificante para  $\beta$ -galactosidasa presentó un tamaño alterado. La caracterización previa por PCR de la región entre los sitios de unión de los oligonucleótidos pGAPF y 3BGALGS, que había resultado del tamaño esperado, permitió reducir la región de alteración a la comprendida entre el sitio de unión del primer 3BGALGS y el sitio BglII interno de la secuencia sintética codificante para  $\beta$ -galactosidasa. Adicionalmente, la caracterización con HindIII de los plásmidos generó todas las bandas teóricas esperadas en los tamaños adecuados y dos bandas adicionales de aproximadamente 400 y 900 pb, por lo cual se puede suponer que alteración en la secuencia se debe a una inserción de ~1300 pb cercana al sitio HindIII ubicado entre el sitio de unión del primer 3BGALGS y el sitio BglII interno de la secuencia sintética codificante para  $\beta$ -galactosidasa. De acuerdo con los resultados expuestos, la construcción de las cepas de *P. pastoris* productoras de  $\beta$ -galactosidasa extracelular falló por una inserción en la secuencia sintética codificante para  $\beta$ -galactosidasa.

La aparición de la inserción en el gen durante el proceso de construcción del vector fue distinta en los dos intentos de construcción de pGAHbGalgs. Durante la primera construcción, la inserción se presentó desde el cultivo de la cepa de *E. coli* EPI300 pCC1-b-GalgsE, a pesar de que el plásmido que contenía esta cepa ya había sido secuenciado y caracterizado por GenScript. Durante la segunda construcción, se empleó una cepa de *E. coli* TOP10 transformada con el plásmido pCC1-b-GalgsL liofilizado, que



teóricamente tenía la secuencia correcta, confirmada por los análisis de GenScript. Antes de iniciar el proceso de construcción, el plásmido pCC1-b-GalgsL de esta cepa se caracterizó por análisis de restricción, concordando con el resultado teórico esperado. Tras la transformación, se encontró una colonia con el plásmido pGAHbGalgs al resultar positiva al PCR con pGAPF y 3BGALGS. Como se pensaba que la inserción había sido provocada por la cepa de *E. coli* EPI300, que nunca se empleó en el segundo intento de construcción, el plásmido pGAHbGalgs resultante se empleó directamente para la transformación de *P. pastoris* KM71. Sin embargo, las clonas de *P. pastoris* obtenidas no presentaron actividad de  $\beta$ -galactosidasa, y el PCR de dos de estas clonas reveló que una no presentaba el gen b-Galgs. La caracterización mediante análisis de restricción de pGAHbGalgs mostró que presentaba una inserción semejante a la del plásmido pGAHbGalgs construido durante la primera clonación, al presentar los mismos patrones de restricción que éste. Por lo tanto, la alteración del plásmido ocurrió después de la transformación de *E. coli* con la ligación para generar el plásmido pGAHbGalgs y no durante el cultivo de la cepa de *E. coli* TOP10 pCC1-b-GalgsL.

En vista de lo ocurrido durante las construcciones de pGAHbGalgs, se decidió repetir el proceso de construcción empleando temperaturas más bajas de cultivo como una posible estrategia para evitar alteraciones en el plásmido, según las recomendaciones para la solución de problemas de transformación de GenScript (<https://www.genscript.com/transformation-troubleshooting-guide.html>). Por lo tanto, todos los cultivos de *E. coli* manipulados durante el tercer intento de construcción se incubaron siempre a temperatura ambiente en vez de 37 °C, ya fueran cultivos en placa de agar o en medio líquido.

En el tercer intento de construcción, las colonias resultantes de la transformación de *E. coli* TOP10 con el plásmido pCC1-b-GalgsL se cultivaron a temperatura ambiente y posteriormente se subcultivaron a temperaturas de 32 y 37 °C con el fin de probar si la temperatura de cultivo alteraba el plásmido. Los resultados de la caracterización por análisis de restricción con HindIII de los plásmidos de estos cultivos mostraron que no se presentó alteración en el plásmido en ninguna de las temperaturas de cultivo, al coincidir con el patrón teórico de restricción sin bandas adicionales. El inserto obtenido a partir de

la digestión preparativa con XhoI y NotI del plásmido pCC1-b-GalgsL, derivado del cultivo de *E. coli* a temperatura ambiente, se verificó con electroforesis con post-tinción, confirmando la escisión y el tamaño del inserto b-Galgs.

Las colonias derivadas de la transformación con la ligación del inserto b-Galgs (sin alteraciones) con en el vector pGAH se caracterizaron mediante análisis de restricción. Se obtuvieron dos patrones principales de bandas: uno coincidió con el patrón teórico del plásmido pGAHFTEII (del que se obtuvo el vector pGAH) y el otro fue completamente distinto a los patrones teóricos o experimentales hasta el momento. La aparición del plásmido pGAHFTEII en las colonias se confirmó por PCR, y probablemente se debió a una purificación inadecuada del vector pGAH por digestiones parciales que ocasionaron que alguna conformación del plásmido migrara al mismo tamaño de banda del vector. Los plásmidos que presentaron el otro patrón de restricción no presentaron amplificación por PCR con los pares de oligonucleótidos pGAPF/3BGALGS, 5BGALGS/3BGALGS, o 5BGALGS/3AOX, y solamente se presentó amplificación con el par pGAPF/3AOX, mostrando la presencia de un inserto de más de 3 kb. Sin embargo, el análisis por PCR directo de conjuntos de colonias extraídas de las placas con el par de primers pGAPF/3BGALGS mostró una leve amplificación en dos tamaños: el esperado de 921 pb y otra banda de cerca de 1900 pb. La amplificación de la banda esperada de 921 pb podría deberse a que algunas colonias presentaran el plásmido pGAHbGalgs no alterado, o a restos del plásmido de la reacción de transformación en la placa, la de 1900 pudo haberse tratado de una inespecificidad. Finalmente, la amplificación por PCR de la reacción de ligación de la tercera construcción con los pares de primers pGAPF/3BGALGS, 5BGALGS/3BGALGS, 5BGALGS/3AOX y pGAPF/3AOX mostró bandas de tamaño correspondiente a las teóricas para el plásmido pGAHbGalgs, sin embargo, no fue posible encontrar colonias con el plásmido pGAHbGalgs que se esperaba.

Debido a las dificultades encontradas durante la construcción del plásmido pGAHbGalgs, se decidió convertir este objetivo a un proyecto de tesis de licenciatura del grupo de trabajo (Pérez-García, tesis por publicar). En dicho estudio, se encontraron algunas de las mismas dificultades del presente trabajo, generando el plásmido pGAHbGalgs solo tras varios intentos de clonación en la cepa de *E. coli* JM109 y con

cambios en las condiciones de generación de células competentes para transformación y en las condiciones de cultivo. Durante los procesos de construcción, se generaron plásmidos semejantes a los encontrados en el tercer intento de construcción del presente estudio, por lo que uno de estos fue secuenciado ya que apareció consistentemente en los dos estudios. La secuenciación reveló que el plásmido contenía una región del genoma de *E. coli*, correspondiente al profago  $\phi 80$ , de 2849 pb y flanqueada por los sitios de restricción XhoI y NotI. Por lo tanto, es muy probable que durante la purificación del plásmido pCC1-b-Galgs para generar el inserto b-Galgs, se hayan incluido restos del genoma de *E. coli*, y al momento de realizar el corte con XhoI y NotI y purificar el fragmento de restricción, el fragmento de genoma contaminante no pudo separarse del inserto b-Galgs por presentar un tamaño similar.

#### **8.4.2. Posibles causas de la mutación**

Los análisis de restricción y PCR realizados durante la caracterización del plásmido pGAHbGalgs de la primera y segunda construcciones llevaron a la conclusión de que existió una zona alterada, comprendida entre las regiones de unión del primer 3BGALGS y el sitio de restricción BglII interno del gen b-Galgs (1531-2673 pb). La presencia de ~1.3 kb extra en esta alteración pudo haber ocasionado que la cepa de *P. pastoris* KM71bGalgs transformada con la ligación en las primeras dos construcciones no presentara actividad de  $\beta$ -galactosidasa, al estar alterada la secuencia del inserto. Se concluyó que el inserto b-Galgs era distinto al teórico. Esta caracterización se realizó después de dos intentos fallidos de transformación de *P. pastoris* KM71bGalgs.

Existen secuencias nucleotídicas cuyas características dificultan su clonación por razones aún desconocidas, por ejemplo las zonas ricas en AT, las secuencias con una marcada estructura secundaria, con promotores o que resulten tóxicas. Un ejemplo de DNA de difícil clonación presentó un porcentaje de AT de 65 % (Godiska 2016), en comparación, la secuencia sintética b-Galgs tiene un contenido de AT de 64.39 %, siendo que este porcentaje es considerado como alto.

La transcripción del DNA clonado puede causar rearrreglos o deleciones de secuencias repetitivas, como repeticiones de di o trinucleótidos o zonas de poli-T. El alto número de copias del vector puede reducir la habilidad de clonar fragmentos largos

(> 8 kb) o de regiones con una marcada estructura secundaria. El superenrollamiento puede inducir cruciformes y otras estructuras secundarias, favoreciendo las deleciones o rearrreglos (Godiska et al. 2009). La secuencia del gen sintético cuenta con trinucleótidos repetidos por estar optimizada con los codones preferenciales para *P. pastoris*. El análisis posterior de las repeticiones de al menos 6 pb en la secuencia mostró que la mayor frecuencia de repeticiones se encontraba en la región de 1501 a 3000 pb de la secuencia del plásmido (432 frecuencias).

Un análisis de las primeras 1000 bases de la secuencia sintética b-Galgs en la herramienta de análisis de genes sintéticos de Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://www.idtdna.com/site/order/geneentry>), empleada para verificar si las secuencias encargadas a esta compañía pueden presentar problemas en la síntesis, indicó que contenía una región de 150 pb a partir de los 66 pb con un contenido de GC de 30.7 %, y que además contenía una región de bajo contenido de GC cerca del extremo 3'. El análisis de las siguientes 1000 pb indicó que se requiere una revisión manual de la secuencia debido a su complejidad. El análisis del resto de la secuencia indicó que posee una región de 150 pb comenzando alrededor de 630 pb con un contenido GC de 30.7 %, y además presenta una repetición de la secuencia TAAGAATTCTTA. Lo anterior pueden ser motivos para considerar a b-Galgs como una secuencia de difícil clonación.

## 8.5. Conclusión

*P. pastoris* KM71LAC412 puede usarse como un sistema de expresión en el que la fase de generación de biomasa pueda alcanzarse en un medio que contenga lactosa. Es posible que la  $\mu$  más baja alcanzada en el cultivo con lactosa representa una desventaja del bioproceso, haciéndolo más largo en comparación con bioprocesos que emplean glucosa o glicerol. Sin embargo, considerando que los efluentes de suero pudiesen ser una fuente económica de carbono, y que su uso puede contribuir a reducir la carga ambiental que el desecho de suero representa, la modificación de *P. pastoris* para usar lactosa como fuente de carbono es el primer paso para diseñar bioprocesos que podrían aprovechar las ventajas de esta fuente de carbono no empleada. Se necesitan estudios posteriores relacionados con la factibilidad del sistema para producir una proteína recombinante adicional y probar el impacto de la lactosa en los rendimientos de producto de las cepas.

En general, aunque el trabajo confirma que el uso de lactosa como fuente de carbono para la producción de proteínas recombinantes no tiene un impacto negativo en los rendimientos de proteínas producidas, se necesitan más estudios para evaluar el impacto de fuentes de carbono ricas en lactosa en el cultivo.

El cultivo empleando lactosuero como medio se debe realizar para determinar las condiciones óptimas de empleo de éste: como concentración de nutrientes, pH, presencia de otros microorganismos, facilidad de purificación de la proteína recombinante, rendimiento de biomasa; con el fin de asegurar que el suero realmente pueda ser aprovechado de forma óptima para bioprocesos con *P. pastoris* modificada genéticamente para consumir lactosa.

Los resultados obtenidos también mostraron que la cinética del crecimiento de *P. pastoris* en medio con lactosa es distinta a la obtenida en las fuentes de carbono que normalmente se emplean en su cultivo. Particularmente, la necesidad de extender el tiempo de cultivo en medio con lactosa para alcanzar densidades celulares equiparables a las obtenidas en medio con glucosa o glicerol representaría un gasto adicional de recursos al momento de llevar a cabo bioprocesos con medio con lactosa. Por lo tanto, sería recomendable determinar la forma de eficientizar el bioproceso. Los resultados de la preparación de los inóculos para los cultivos de inducción de este estudio, en comparación con los del estudio previo (Balderas-Cisneros 2016), mostraron que una mayor densidad celular inicial en el cultivo disminuye el tiempo necesario para alcanzar la densidad celular requerida, lo cual podría ser uno de los parámetros que se deberían considerar al momento de la optimización.

## 9. CONCLUSIONES

Este estudio evaluó el impacto presentado al cultivar en medio con lactosa a cepas de *P. pastoris* modificadas genéticamente para degradar lactosa intracelularmente, particularmente el efecto en el  $Y_{x/s}$ , el  $Y_{p/x}$  y la respuesta transcripcional global y específica de genes regulados por  $P_{AOXI}$  y  $P_{GAP}$ .

*P. pastoris* KM71LAC412 empleó la lactosa emulando a un cultivo en condiciones limitantes de glucosa, debido a un transporte limitado de lactosa y a una actividad de la  $\beta$ -galactosidasa afectada por inhibición por producto, ocasionando crecimiento limitado con una fase lag de mayor duración y  $Y_{x/s}$  menores a los obtenidos en glucosa; su  $\mu$  fue significativamente menor en lactosa que en glucosa y glicerol, alcanzando ~10 % del valor obtenido en estas últimas fuentes de carbono, y el  $Y_{x/s}$  por mol de sustrato fue menor en lactosa que en glucosa, alcanzando ~60 % del valor obtenido en esta última, lo cual sugiere que no toda la glucosa proveniente de la lactosa se usó para la generación de biomasa celular.

El uso de lactosa en lugar de glucosa por KM71LAC412 modificó la transcripción de ~40 % de los genes, alteró la transcripción de genes de enzimas del metabolismo central y disminuyó la expresión de genes de transportadores de carbohidratos; la mayor actividad transcripcional presentada por los genes de las vías de glucólisis/gluconeogénesis y de las pentosas fosfato sugiere una demanda en la síntesis de glucosa correlacionada posiblemente con las condiciones limitantes de sustrato. El cultivo en lactosa con metanol presentó mayor nivel transcripcional de los genes de asimilación de metanol y menor de los de gluconeogénesis comparado con el cultivo en lactosa, indicando que el metabolismo del metanol está favorecido.

Las cepas modificadas para la expresión de genes regulados por  $P_{AOXI}$ , expresaron los genes heterólogos cuando se cultivaron en lactosa para generar biomasa y se indujo su expresión con metanol sin presentar disminución en los rendimientos  $Y_{p/x}$  ni en niveles transcripcionales de los genes regulados por el  $P_{AOXI}$  en comparación con los cultivos en glicerol para generar biomasa. Se obtuvo un mayor  $Y_{p/x}$  de hGH en KM71HGH22K-LAC a 30 °C en lactosa inicial en comparación con glicerol inicial y no se presentaron

diferencias significativas de los  $Y_{p/x}$  obtenidos en los cultivos en KM71FTEII-LAC. Los niveles de los transcritos de *HGH* y *FTEII* no tuvieron una clara correlación con los  $Y_{p/x}$  bajo las condiciones de inducción con metanol, indicando que los niveles de expresión transcripcional no son los únicos factores que impactan en los niveles de producción.

El empleo de lactosa como sustrato provocó una disminución de la actividad observada de  $\beta$ -galactosidasa respecto a glicerol, a pesar de que el nivel transcripcional de *LAC4* a las 0 h de inducción en todas las condiciones fue similar. La inducción con metanol provocó una menor actividad de  $P_{GAP}$ , como consecuencia, los niveles de transcritos y la actividad de  $\beta$ -galactosidasa observada disminuyeron.

La actividad de  $\beta$ -galactosidasa en los cultivos de las cepas de *P. pastoris* KM71bGalgs construidas no fue detectada, siendo la causa más probable de este hecho la presencia de mutaciones del plásmido empleado para la transformación al momento de propagarse en *E. coli*.

## 10. PERSPECTIVAS

Al haber logrado determinar que el uso de lactosa como fuente de carbono para generación de biomasa, en comparación con glicerol, no ocasiona un impacto negativo en la expresión de los genes heterólogos regulados por  $P_{AOXI}$  y  $P_{GAP}$ , se podría llevar a cabo un escalamiento del bioproceso. El presente trabajo se realizó con estudios a nivel matraz, por lo cual el siguiente paso sería comprobar el impacto de la lactosa como fuente de carbono en un bioproceso a mayor escala en fermentador y determinar las condiciones y tiempos de cultivo que permitan obtener un buen rendimiento de proteína heteróloga.

Ya que la  $\beta$ -galactosidasa presenta la actividad necesaria para que el cultivo crezca, otro proyecto consistiría en purificar la  $\beta$ -galactosidasa intracelular producida por las cepas de *P. pastoris* empleadas en este estudio, y determinar sus parámetros bioquímicos en preparaciones con un mayor grado de pureza, en lugar de emplear los lisados celulares evaluados en este estudio.

Otro estudio posterior consistiría en emplear lactosuero como medio de cultivo, ya que en este estudio se empleó medio mínimo con lactosa. Se debe determinar si es posible emplearlo directamente o si se requiere diluirlo o modificarlo para preparar un medio de cultivo a base de lactosuero.

Puesto que no fue posible realizar la construcción de la cepa de *P. pastoris* productora de  $\beta$ -galactosidasa extracelular, ya que el hospedero intermediario para la propagación del plásmido alteró la secuencia de éste dejándola inutilizable para la expresión de la proteína en la levadura, se deberían hacer modificaciones a la estrategia de clonación. Una de estas consistiría en el uso de otro método de optimización de codones preferenciales, en el que se conservaran las frecuencias de aparición de codones del organismo en el gen en lugar de sustituir todos los codones por el más frecuente, con el fin de disminuir la posibilidad de aparición de repeticiones que pudiesen ocasionar rearreglos. Además, la secuencia se debería verificar para presentar un porcentaje de GC en la secuencia similar al de otros genes de los organismos en los que se propagará. Otra opción consistiría en emplear otras cepas de *E. coli* capaces de clonar DNA inestable.



Al momento de la escritura de la presente tesis llevó a cabo una tesis de licenciatura (Pérez-García, tesis por publicar) en la que se intentó realizar la construcción del plásmido que se describe en el presente trabajo. Los primeros intentos presentaron resultados similares a los ya expuestos o distintos a los esperados. Sin embargo, el uso de una cepa diferente de *E. coli* y de una menor temperatura de cultivo permitieron obtener un plásmido con una caracterización por PCR y análisis de restricción que coincide con el plásmido que se buscaba construir. Además, se envió a secuenciar un plásmido obtenido en los primeros intentos de transformación que aparentemente presentó la misma alteración que los plásmidos obtenidos en el tercer intento del presente trabajo.

## ANEXO 1. SOLUCIONES Y REACTIVOS

Todas las soluciones preparadas se almacenaron a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario. Cuando se indique esterilización, se refiere a esterilización por autoclave, a menos que se indique por filtración.

### Extracción y análisis de ácidos nucleicos

- **Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10 %**. Disolver 10 g de SDS y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Calentar a 68 °C para facilitar su disolución.
- **Buffer Tris-EDTA (TE) pH 8.0, 1X** (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0). Mezclar 2 mL de EDTA 500 mM pH 8.0 con 10 mL de Tris-Cl pH 8.0. Aforar a 1 L con agua destilada. Esterilizar.
- **Tris-Cl 500 mM pH 8**. Disolver 6.05 g de Tris-HCl en 50 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 8 con HCl. Aforar a 100 mL con agua bidestilada. Esterilizar.
- **EDTA 500 mM pH 8.0**. Disolver 186.1 g de EDTA disódico dihidratado en 800 mL de agua bidestilada, para su completa disolución, ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10N. Aforar a 1 L. Esterilizar.
- **NaOH 10 N**. Disolver 10 g de NaOH anhidro en agua ultrapura a 25 mL. Esterilizar.
- **Solución amortiguadora de lisis TSNT** (Tritón X-100 2 %, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tris-Cl 100 mM pH 8.8, EDTA 1 mM). Disolver 500 µL de Tritón X-100 y 146.25 mg de NaCl en 15 mL de agua bidestilada, agregar 2.5 mL de SDS al 10 %, agregar 500 µL de Tris-Cl 500 mM pH 8 y 50 µL de EDTA 500 mM. Aforar a 25 mL. Esterilizar.
- **Agarosa 0.8 % o 1.5 %**. Mezclar 0.8 g o 1.5 g de agarosa, según el porcentaje correspondiente, con 100 mL de buffer TBE 1X. Calentar de 1 a 2 min. Para preparar un gel, vaciar en el molde y dejar solidificar.
- **Buffer TBE (Solución stock 10X)**. Disolver 108 g de Trizma base, 55 g de ácido bórico y 9.3 g de EDTA disódico dihidratado en 600 mL de agua bidestilada, aforar a 1000 mL con agua bidestilada y esterilizar.
- **Buffer TBE (Solución de trabajo 1X)**. Mezclar 100 mL de TBE 10X y agregar 900 mL de agua bidestilada.

- **SEVAG (Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1)**. Mezclar 24 mL de cloroformo y 1 mL de alcohol isoamílico. No esterilizar.
- **GelRed 100X** (Solución para tinción de muestra antes de electroforesis). Disolver 20 µL de GelRed Nucleic Acid 10000X (Solución stock) en un volumen final de 2 mL de NaCl 100 mM. Almacenar en oscuridad.
- **GelRed 3X** (Solución para tinción de geles de agarosa después de electroforesis). Disolver 15 µL de GelRed 10000X (Solución stock) en 40 mL de agua bidestilada. Almacenar en oscuridad.

#### Transformación en bacterias

- **Medio SOC** (Tryptona 2 %, Extracto de levadura 0.5 %, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, Mg<sup>2+</sup> 20 mM, Glucosa 20 mM). Disolver 2 g de triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 1 mL de NaCl 1 M y 1 mL de KCl 1 M en 97 mL de agua bidestilada. Agitar hasta disolver. Esterilizar por autoclave y enfriar a temperatura ambiente. Añadir 1 mL de stock de Mg<sup>2+</sup> 2 M y 1 mL de glucosa 2 M. Aforar a 100 mL con agua bidestilada estéril.
- **NaCl 1 M**. Disolver 5.84 g de NaCl y aforar a 50 mL con agua bidestilada. Esterilizar por filtración.
- **KCl 1 M**. Disolver 3.72 g de KCl y aforar a 50 mL con agua bidestilada. Esterilizar por filtración.
- **Glucosa 2 M**. Disolver 36.04 g de D-glucosa en 50 mL de agua bidestilada estéril. Aforar a 100 mL con agua bidestilada estéril. Esterilizar por filtración.
- **Stock de Mg<sup>2+</sup> 2 M**. Disolver 9.52 g de MgCl<sub>2</sub> y 24.65 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O en 100 mL de agua bidestilada estéril. Esterilizar por filtración.
- **CaCl<sub>2</sub> 1 M**. Disolver 11.1 g de CaCl<sub>2</sub> en 80 mL de agua bidestilada. Aforar a 100 mL. Esterilizar
- **X-Gal (50 mg/mL)**. Se empleó una solución preparada por Promega (Promega Núm.. Cat. V3941), almacenada a -20 °C hasta su uso.
- **Medio Luria-Bertani (Medio LB) con antibiótico\*** (Bactotriptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 1 %). Disolver 10 g de bactotriptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 1 L de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH

10 M. Cuando se requiera agar, adicionar a la mezcla anterior 15 g de agar bacteriológico. Esterilizar. \*Si se requiere que el medio o el agar contenga antibiótico, esperar a que el medio o el agar se enfríe (sin que solidifique) y agregar ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL o cloranfenicol a una concentración final de 25 µg/mL. Homogeneizar y preparar alícuotas en tubos estériles, o vaciar el agar en cajas de Petri. Almacenar las placas de agar a 4 °C.

- **Ampicilina (100 mg/mL).** Disolver 1 g de ampicilina en 10 mL de agua bidestilada previamente esterilizada. Esterilizar por filtración. Almacenar a -20 °C hasta su uso.
- **Cloranfenicol (5 mg/mL).** Se empleó una solución preparada de cloranfenicol oftálmico.

#### Preparación de levaduras electrocompetentes

- **Sorbitol 1 M.** Disolver 9.1 g de sorbitol en 50 mL de agua bidestilada. Esterilizar.
- **HEPES 1 M.** Disolver 2.61 g de DTT en 10 mL de agua bidestilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4 °C hasta su uso.
- **DTT 1 M.** Disolver 1.54 g de DTT en 10 mL de agua bidestilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4 °C hasta su uso.

#### Transformación en levaduras

- **YPD/ YPD agar** (Extracto de levadura 1 %, peptona 2 %, glucosa 1 %). Disolver 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de glucosa en 1 L de agua bidestilada. Esterilizar. Cuando se requiera YPD agar, preparar la mezcla anterior y agregar 20 g de agar, mezclar bien y esterilizar. Dejar enfriar y verter cuidadosamente en placas Petri. Almacenar las placas de agar a 4 °C.
- **Glucosa 20 %.** Disolver 20 g de glucosa en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración.
- **Medio RDB** (Sorbitol 1 M, agar 2 %, glucosa 2 %, YNB 1.34 %, biotina 4X, 10<sup>-5</sup> %, aminoácidos 0.005 %). Disolver 93 g de sorbitol y 10 g de agar bacteriológico en 350 mL de agua bidestilada. Esterilizar, enfriar y mantener a 60 °C. Añadir a 44 mL de agua bidestilada estéril 50 mL de glucosa 20 %, 50 mL YNB 10X, 1 mL de biotina 500X, 5 mL de aminoácidos 100X y precalentar a 45 °C. Adicionar la mezcla

precalentada a 45 °C, al sorbitol y agar mantenidos a 60 °C (345 mL de agua estéril más sorbitol y agar). Homogeneizar, vaciar en cajas de Petri, y sellar una vez que solidifique el medio. Almacenar las placas de agar a 4 °C.

#### Reactivación e inducción en *Pichia pastoris*

- **Buffer de fosfatos 1 M, pH 6.** Disolver 1.03 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 12.8 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o con KOH, aforar a 100 mL y esterilizar. Almacenar a -20 °C.
- **YNB 10X** (Base de levadura nitrogenada con sulfato de amonio y sin aminoácidos 13.4 %). Disolver 134 g de YNB en 1000 mL de agua destilada, esterilizar por filtración.
- **Biotina 500X** (Biotina 0.02 %). Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración y almacenar a 4 °C.
- **Glicerol 10 % v/v.** Mezclar 100 mL de glicerol absoluto y aforar a 1 L con agua bidestilada. Esterilizar.
- **Aminoácidos 100X** (0.5 % de cada Aminoácido). Disolver 500 mg de los siguientes aminoácidos: ácido L-glutámico, L-metionina, L-lisina, L-leucina e isoleucina en 100 mL de agua. Esterilizar por filtración y almacenar a 4 °C. La vida media de esta solución es aproximadamente 1 año.
- **BMG** (Medio mínimo amortiguado y con glicerol 1 %) (Fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34 %, biotina 1X, glicerol 1 %). Para 100 mL de BMG, mezclar 10 mL de buffer de fosfatos 1 M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 0.2 mL de biotina 500X, 10 mL de glicerol 10 % v/v y 70 mL de agua bidestilada estéril. Realizar prueba de esterilidad a 30 °C antes de su uso.
- **BMM** (Medio mínimo amortiguado y con metanol 0.75 %) (Fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34 %, biotina 1X, metanol 0.75 %). Para 100 mL de BMM, mezclar 10 mL de buffer de fosfatos 1 M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 0.2 ml de biotina 500X, 750 µL de metanol absoluto y aforar a 100 mL con agua bidestilada estéril. Realizar prueba de esterilidad a 30 °C antes de su uso.
- **BMM-CaCl<sub>2</sub>** (Medio mínimo amortiguado con metanol 0.75 % y CaCl<sub>2</sub> 0.1 %) (Fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34 %, biotina 1X, metanol 0.75 %, CaCl<sub>2</sub> 0.1 %).

CaCl<sub>2</sub> 0.1 %). Para 100 mL de BMM-CaCl<sub>2</sub>, mezclar 10 mL de buffer de fosfatos 1 M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 0.2 mL de biotina 500X, 895 µL de CaCl<sub>2</sub> 11.098 % (100 mM), 750 µL de metanol absoluto y aforar a 100 mL con agua destilada estéril. Realizar prueba de esterilidad a 30 °C antes de su uso.

#### Medios de cultivo para cinéticas de crecimiento

- **BMGlc** (Medio mínimo amortiguado suplementado con glucosa 30 mM) (Fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34 %, biotina 1X, glucosa 30 mM). Para 100 mL de BMGlc, mezclar 10 mL de buffer de fosfatos 1 M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 0.2 mL de biotina 500X, 2.5 mL de glucosa 20 % y 77.3 mL de agua bidestilada estéril. Realizar prueba de esterilidad a 30 °C antes de su uso.
- **BMGly** (Medio mínimo amortiguado suplementado con glicerol 30 mM) (Fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34 %, biotina 1X, glicerol 30 mM). Para 100 mL de BMG, mezclar 10 mL de buffer de fosfatos 1 M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 0.2 mL de biotina 500X, 2.7 mL de glicerol 10 % p/v y 77.1 mL de agua bidestilada estéril. Realizar prueba de esterilidad a 30 °C antes de su uso.
- **Glicerol 10 % p/v**. Pesar 10 g de glicerol absoluto y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Esterilizar.
- **BMLac** (Medio mínimo amortiguado suplementado con glucosa 30 mM) (Fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34 %, biotina 1X, lactosa 30 mM). Para 100 mL de BMLac, mezclar 10 mL de buffer de fosfatos 1 M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 0.2 mL de biotina 500X, 10 mL de lactosa 10 % y 69.8 mL de agua bidestilada estéril. Realizar prueba de esterilidad a 30 °C antes de su uso.
- **Lactosa 10 %**. Disolver 10.53 g de lactosa monohidratada en 80 mL de agua bidestilada estéril hasta que la solución se torne clara (sin partículas o turbia). El calentamiento a 37 °C acelera el proceso de disolución. Aforar a 100 mL con agua bidestilada estéril. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4 °C.
- **BMLacMet** (Medio mínimo amortiguado suplementado con lactosa 30 mM y metanol 0.75 %). Añadir 750 µL de metanol absoluto a 100 mL de BMLac. Realizar prueba de esterilidad a 30 °C antes de su uso.

### Determinación de lactosa

- **Metilamina-HCl 5 %.** Pesar 2 g de metilamina-HCl y aforar a 40 mL con agua ultrapura estéril. Almacenar a 4 °C.
- **Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 1 %.** Pesar 100 mg de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, aforar a 10 mL con agua ultrapura estéril. Preparar el mismo día de uso.
- **NaOH 1M.** Pesar 400 mg de NaOH, aforar a 10 mL con agua ultrapura estéril.
- **Solución de NaOH-KCl.** Mezclar 50 mL de KCl 0.2 M con 82.4 mL de NaOH 0.2 M.
- **KCl 0.2 M** (pH ~6.63). Pesar 2.9821 g de KCl, aforar a 200 mL con agua ultrapura estéril.
- **NaOH 0.2 M** (pH ~13.33). Pesar 1.5998 g de NaOH, aforar a 200 mL con agua ultrapura estéril.

### Actividad de β-galactosidasa

- **Buffer de lisis** (fosfato de sodio 50 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, glicerol 5 %). Preparar una solución stock de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 10 mM y almacenar a 4 °C. Disolver en 900 mL de agua ultrapura 6 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, 372 mg de EDTA y 50 mL de glicerol. Ajustar el pH a 7.4 con NaOH y almacenar a 4 °C. Preparar la solución de trabajo haciendo una dilución 1:10 del inhibidor de proteasas PMSF 10X con el resto de los reactivos disueltos antes de usar. No esterilizar por autoclave.
- **Buffer Z** (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 1 mM y β-mercaptoetanol 50 mM). Disolver en 950 mL de agua ultrapura: 16.1 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 5.5 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, 0.75 g de KCl, 0.246 de MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O y 2.7 mL de β-mercaptoetanol. Ajustar a pH 7 con HCl o NaOH y aforar a 1 L con agua ultrapura. No esterilizar por autoclave. Almacenar a 4 °C.
- **Solución de ONPG** (ONPG 4 mg/mL en buffer de fosfatos 100 mM, pH 7). Disolver en 90 mL de agua ultrapura 1.61 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O y 0.55 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, ajustar a pH 7 con HCl o NaOH y añadir 400 mg de ONPG. Agitar en vórtex para su disolución, aforar a 100 mL con agua ultrapura. Almacenar a 4 °C protegido de la luz.
- **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M.** Disolver 12.4 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 100 mL de agua ultrapura.

## ELISA

- **Buffer de Carbonatos 10X (100 mL).** Pesar 1.5 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 2.93 g de  $\text{NaHCO}_2$ , disolver y aforar a 1 L con agua bidestilada. Filtrar la solución con filtro de poro 0.2  $\mu\text{M}$ . Diluir 1:10 con agua bidestilada para preparar la solución de trabajo 1X.
- **TBS 1X.** Pesar 1.2 g de Trizma Base y 8.7 g de  $\text{NaCl}$  (concentración final 1.5 M), disolver en 500 mL de agua bidestilada (no estéril) y aforar a 1 L con agua bidestilada. Filtrar la solución con un filtro de poro 0.2  $\mu\text{M}$ .
- **TBS-T 0.05 %.** Añadir 250  $\mu\text{L}$  de Tween 20 (en aceite) a 500 mL de TBS. La solución debe prepararse el mismo día de uso para evitar la formación de precipitado. Se emplean aproximadamente 500 mL por placa de 96 pozos.
- **Reactivo cromogénico (pNPP).** Mezclar 1 mL Trietanolamina y 9 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 9.6 antes de disolver la pastilla de para-Nitrofenilfosfato (pNPP). Disolver 2 pastillas de pNPP, (Sigma N2765), cada pastilla pesa ~5 mg. Preparar justo antes de usarse. Preparar los 10 mL si se emplean todos los pocillos de la placa, si no, usar menos volumen y disolver sólo una pastilla.
- **Stock Conjugado anti-IgG (anti-anti-hGH).** Disolver 33  $\mu\text{L}$  de conjugado en 1000  $\mu\text{L}$  de glicerol 50 %.
- **Conjugado anti-IgG.** Se empleó anti-IgG de conejo producido en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma, Cat. A3812, Anti-Rabbit IgG, whole molecule).
- **Anticuerpo anti-HGH.** Se emplearon alícuotas de Affinity Purified Antibody Anti-HGH22, por GenScript, con una concentración de 1.152 mg/mL.

## Determinación de proteínas totales por el método de Bradford

- **Reactivo de Bradford.** Disolver 100 mg del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95 %. Agitar vigorosamente. Agregar 100 mL de ácido fosfórico al 85 %. Mezclar vigorosamente por 20-30 min. Llevar a 1 L con agua destilada, agitar por 20-30 min y filtrar con papel Whatman no. 1 para eliminar el colorante no disuelto. Guardar el reactivo en un frasco oscuro a 4 °C.
- **Solución de albúmina sérica bovina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).** Preparar un stock de ASB 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , disolviendo 5 mg de ASB en 5 mL de agua destilada. Colocar 250  $\mu\text{L}$  de ASB 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y aforar a 5 mL con agua destilada.



## Electroforesis SDS-PAGE

- **Acrilamida-bisacrilamida.** Se empleó una solución preparada por BIORAD (BIORAD Núm. Cat. 161-0154) que contiene los siguientes componentes: Acrilamida 28.5 %, N,N'-metilen-bis-acrilamida 1.5 % (Proporción 19:1). Esta solución se empleó directamente de la botella. Esta solución es almacenada a 4 °C hasta su uso sin desgasificar.
- **Buffer Tris-Cl/SDS pH 8.8 4X.** Disolver 9.1 g de Trizma base en 30 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 50 mL con agua bidestilada. Agregar 0.2 g de SDS sólido y disolver. Almacenar a 4 °C hasta un mes.
- **Buffer Tris-Cl/SDS pH 6.8 4X.** Disolver 0.605 g de Trizma base en 5 mL de agua. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 10 mL con agua destilada. Agregar 0.04 g de SDS sólido y disolver. Almacenar a 4 °C hasta un mes.
- **Persulfato de amonio (10 %).** Disolver 200 mg de persulfato de amonio en 2 mL de agua bidestilada. Almacenar a 4 °C. La vida media de esta solución es aproximadamente 2 semanas.
- **Buffer de electroforesis SDS-PAGE 5X.** Pesar 3.8 g de Trizma base, 18.0 g de glicina, 1.3 g de SDS y disolver cuidadosamente en 150 mL de agua bidestilada. Aforar a 250 mL con agua bidestilada. Guardar en refrigeración. Diluir a 1X con agua bidestilada justo antes de usarse.
- **Azul brillante de Coomassie (tinción SDS-PAGE)** (Azul brillante de Coomassie R250 0.05 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %). Disolver 0.05 g de azul brillante de Coomassie R250 en 30 mL de agua bidestilada. Agregar 50 mL de metanol y 1 mL de ácido acético. Aforar a 100 mL. Almacenar a 4 °C protegido de la luz.
- **Solución fijadora** (metanol 50 %, ácido acético 10 %). Mezclar 250 mL de metanol, con 50 mL de ácido acético y aforar con agua destilada a 500 mL. Almacenar a temperatura ambiente.
  - **Solución decolorante** (metanol 5 %, ácido acético 7 %). Mezclar 50 mL de metanol con 70 mL de ácido acético, y aforar con agua destilada a 1 L. Almacenar a temperatura ambiente.

## ANEXO 2. SECUENCIAS NUEVAS

### Generación de la secuencia de *aox1::ARG4*

Se mapearon las lecturas de los archivos de los transcriptomas disponibles en el grupo de trabajo (GLC-pPIC9, GLC-LAC412, GLC-LAC412 [2 replicados], LACMET-LAC412, y los archivos de transcriptomas empleado en otro análisis del grupo de trabajo (Fernández-Cano 2015): C0, CP47, CP adicional y CM47 [2 replicados]). Se usó como archivo de referencia un archivo con el genoma de la cepa GS115 incluyendo el rDNA, el genoma mitocondrial de la cepa CBS7435, y las secuencias de los plásmidos pPIC9 (sin el inserto de FTEII) y pGAP-LAC412, sin modificar los parámetros de mapeo empleados originalmente, excepto que se indicó al programa TopHat2 generar un archivo con las secuencias no mapeadas.

Las secuencias no mapeadas de la cepa GLC-LAC412 (por ser el archivo de menor tamaño de los generados) se ensamblaron con el programa CAP3 (Huang y Madan 1999) empleando el portal Mobyle@Pasteur, y los contigs resultantes se volvieron a ensamblar. Uno de los contigs presentaba la mayor parte del gen *ARG4*. El resto del gen se ensambló manualmente usando como base las secuencias reportadas de los genes *AOX1* y *ARG4*, mediante la búsqueda de segmentos traslapados en las secuencias del archivo original de lecturas no mapeadas. No pudieron encontrarse dos regiones de 31 y 51 pb entre las lecturas no mapeadas de GLC-LAC412, pero sí se encontraron entre las no mapeadas de un replicado de LAC-LAC412.

Al comparar las secuencias de las lecturas durante el ensamblaje manual se encontraron diferencias en algunos nucleótidos con la secuencia reportada para el gen *AOX1* de *P. pastoris*, por lo que se decidió hacer un reensamblaje usando únicamente las secuencias similares al transcrito, pero esta vez empleando los archivos no mapeados de todas las condiciones. Para lograrlo, se crearon bases de datos locales de estos archivos con el programa BioEdit y se hizo BLAST con la secuencia preliminar del gen *aox1::ARG4*. Se obtuvieron las secuencias reportadas como similares en todas las condiciones y se compilaron en un solo archivo en formato FASTA. Este archivo se utilizó para hacer un nuevo ensamblaje con CAP3. Se hizo un alineamiento en BLAST de los

contigs resultantes con la secuencia preliminar y se encontró uno que abarcaba la mayor parte de ésta (nucleótidos 1 a 4157), aunque no cubría la segunda parte del gen original *AOXI*. Este contig presentaba mismatches, la C en la posición 3650 de la secuencia preliminar era G en el contig, y la C en 3821 era T en el contig, por lo cual se corrigieron en la secuencia.

Puesto que no se encontraron contigs que alinearan con la segunda parte de la secuencia original, se realizó en BioEdit otro BLAST contra las secuencias no mapeadas, esta vez empleando como query la secuencia a partir de la posición 3709 del transcrito preliminar y aumentando el valor E a 0.00001. Las secuencias obtenidas se ensamblaron con CAP3 y los contigs se alinearon con la secuencia preliminar con las correcciones. Se encontró un contig que cubría la mayor parte de la segunda mitad de la secuencia original (nucleótidos 3771 a 5643) y que presentaba algunas diferencias: la T en 4212, la A en 4439 y la C en 4471 en la secuencia preliminar eran A, T y T respectivamente en el contig, por lo que se corrigieron en el transcrito.

### **Regiones y ubicación en pb**

- Secuencia upstream de *AOXI*, presente en el cromosoma 4 de *P. pastoris*: 1 – 537
- Inicio del gen *AOXI*, según la secuencia reportada del gen *AOXI* de la cepa NRRL Y-11430 [U96967.1]: 538 – 1006
- Primera parte de la secuencia codificante de *AOXI*, en negritas: 1007 – 1051
- Parte de un gen de resistencia a tetraciclina que formaba parte del vector empleado para introducir el gen *ARG4* de *S. cerevisiae*: 1052 – 1394
- Gen *ARG4* de *S. cerevisiae*. No es completamente idéntico al de las cepas de *S. cerevisiae* reportadas en las bases de datos, presenta una delección de 5 nucleótidos: 1395 – 4039
- Secuencia codificante de *ARG4* de *S. cerevisiae*, subrayada: 1899 – 3290
- Segunda parte de la secuencia codificante de *AOXI*, en negritas: 4040 – 5348
- Final del gen *AOXI*, según U96967.1. Debido a que esta región se encuentra presente en varios vectores, es mejor descartarla al momento de diseñar primers: 5349 – 5614

1 TGACTCATGT TGGTATTGTG AAATAGACGC AGATCGGGAA CACTGAAAAA TAACAGTTAT  
61 TATTCGAGAT CTAACATCCA AAGACGAAAG GTTGAATGAA ACCTTTTTTC CATCCGACAT  
121 CCACAGGTCC ATTCTCACAC ATAAGTGCCA AACGCAACAG GAGGGGATAC ACTAGCAGCA  
181 GACCGTTGCA AACGCAGGAC CTCCACTCCT CTTCTCCTCA ACACCCACTT TTGCCATCGA  
241 AAAACCAGCC CAGTTATTGG GCTTGATTGG AGCTCGCTCA TTCCAATTCC TTCTATTAGG  
301 CTAATAACAC CATGACTTTA TTAGCCTGTC TATCCTGGCC CCCCTGGCGA GGTTTCATGTT  
361 TGTTTATTTT CGAATGCAAC AAGCTCCGCA TTACACCCGA ACATCACTCC AGATGAGGGC  
421 TTTCTGAGTG TGGGGTCAAA TAGTTTCATG TTCCCCAAAT GGCCCCAAAC TGACAGTTTA  
481 AACGCTGTCT TGGAACCTAA TATGACAAAA GCGTGATCTC ATCCAAGATG AACTAAGTTT  
541 GGTTTCGTTGA AATGCTAACG GCCAGTTGGT CAAAAAGAAA CTTCCA AAAAG TCGGCATACC  
601 GTTTGTCTTG TTTGGTATTG ATTGACGAAT GCTCAAAAAT AATCTCATT AATGCTTAGCG  
661 CAGTCTCTCT ATCGCTTCTG AACCCCGGTG CACCTGTGCC GAAACGCAAA TGGGGAAACA  
721 CCCGCTTTTT GGATGATTAT GCATTGTCTC CACATTGTAT GCTTCCAAGA TTCTGGTGGG  
781 AATACTGCTG ATAGCCTAAC GTTCATGATC AAAATTTAAC TGTTCTAAC CCTACTTGAC  
841 AGCAATATAT AAACAGAAGG AAGCTGCCCT GTCTTAAACC TTTTTTTTTT TCATCATTAT  
901 TAGCTTACTT TCATAATTGC GACTGGTTCC AATTGACAAG CTTTTGATTT TAACGACTTT  
961 TAACGACAAC TTGAGAAGAT CAAAAACAA CTAATTATTC GAAACGATGG **CTATCCCCGA**  
1021 **AGAGTTTGAT ATCCTAGTTC TAGGTGGTGG ATCCACAGGA** CGGGTGTGGT CGCCATGATC  
1081 GCGTAGTCGA TAGTGGCTCC AAGTAGCGAA GCGAGCAGGA CTGGGCGGGC GCCAAAGCGG  
1141 TCGGACAGTG CTCCGAGAAC GGGTGCGCAT AGAAATTGCA TCAACGCATA TAGCGCTAGC  
1201 AGCACGCCAT AGTGACTGGC GATGCTGTCG GAATGGACGA TATCCC GCAA GAGGCCCGG  
1261 AGTACCGGCA TAACCAAGCC TATGCCTACA GCATCCAGGG TGACGGTGCC GAGGATGACG  
1321 ATGAGCGCAT TGTTAGATTT CATAACGGT GCCTGACTGC GTTAGCAATT TAACTGTGAT  
1381 AAACCTACCGC ATTAAGCTT GGAATCCTGC AGATTGGGTC ACAACCATCG AACTATAAAT  
1441 TTTTGAGAAT GGCCGGTTCA GACATTCACG AGGCCCTACA TTATCCAGTT TACAAAATGA  
1501 TAATGAGTGC GAATGGGTAT AAACTAAGC AACTGCTAAG TTGGTTAAC ACTTTGGGAG  
1561 GTTACAATAG TGTGTATTAT TGCGGCGGTT TTAGTTATTT AGTCTCATGG CCATTGTCTT  
1621 CACTATATAT CAACCATCAC ACACGCTTTT CCCTGAAACG CTTGAGAGGA AGATTAGCCA  
1681 AGGTATATAG CAGCATTATT TCGTTTTTTTT GCCGGTCATC TTCTAAATCA TCCAAATAAT  
1741 ATCCTTGATT AGATAACAAT TGCTTATCTA CGTATATATA TACATAGCAC AATCTCGAAA  
1801 ATATAATACT AATAACAAAA TAAGTATTTA AAGAAGGGTT GATGAAGTCC TAGAAGTACC  
1861 AGACCTGATG AAATTCTTGC GCATAACGTC GCCATCTGCT AATTTAATTG GGATTTCAAA  
1921 TTATCCAATT GCTTCAATAC AGCAGATTTA GCGGTTCCAC CAGTAGCATC TCGTCTTTCA  
1981 ACGCTTTGTT CAAAGTTAAA AGTTTCAAAA AGATCTTGTC CGAATCTCGA ATCGATCTTT  
2041 TGATACTGCT CCAAGGTTAA TTTATCAATA CCGCTTAGAC CAAGTCTTTC AGCAGTAGCG  
2101 ACACACTCAC CAGATATGTG ATGAGTCTCT CTGAATGGAA CACCCTTCT GACCAAGTAA  
2161 TCTGCCAAGT CGGTAGCTAG CATATCCATC GTGAGAGCAG CTTCCATCTT TTCCTTATTT  
2221 ACAGTTAAGG TAGAAATAAC ACCTGTGGCA ATCAGCATGG AGTGCTCTAC AGTTGTTAAG  
2281 CAATCGAATA GTGGCTCTTT GTCTTCTTGC ATGTCTTTAT CATAAGTAGA TGGGATACCC  
2341 TTCAAACCTCA TCAAGAATCC TGTCAGATCA CCAAATACTC TACCGGATTT ACCTCTTAAC  
2401 AACTCTAACG AGTCTGCATT CTTCTTCTGA GGCATTAAG AAGAACCCTGT TGAATAGGGC  
2461 TCGCTCAACT GTATGAAACC AAATTCTGCT GTACAATATA TAATCAAATC TTCAGCAAAA  
2521 CGAGAAATAT GGTTTCATGAA CAAAGTTCCC CAAAACATCA ACTCCACGAT GAAATCTCTA  
2581 TCAGAAACAG CAACCAAGGA GTTACCAATT AACTATTGA AACCCAAACC TTCAGCCAAA  
2641 AATTCTCTAT CAATGCCGTA AGGATGACCA GCAAGAGCGC CTGCACCCAG TGGTGATTGA  
2701 TTCAATCTGT GTAGTATTTG ACCCAGTCTC TTGTAATCTT CGGTGAAGTA TGTTGCATAA  
2761 GAGCTCAACC AATGAGACCA TCTAATAGGT TGTGCCCTTT GTAAATGTGT GTAGCCTGGC  
2821 ATTAAGACAT CTATCTCACC TTCGGCCCTC TTAATTAGAA CTTCAACCAA GCCCTTTAAA  
2881 GCTGGAAAGA GGGTGTCAAT GACAATGTCA CGACAGTATA TTCTCAAATC GGTAACAACCT  
2941 TGATCATTAC GGGATCTACC GGTGTGGACT TTACCAGCAA TATCGCGGCC AATTAGTTCA  
3001 CCAAGACGTC TTTCAATTCG AGTATGGATA TCCTCGTCGT TTGGATGACG GACAAATTTG  
3061 TCAGCGTCCC ATTCTTTTTT GATTTTCAGCC AAACCTTCAT GGATCTTTGC CAATTCTGTC  
3121 TCCGTTAGAA GACCCAACTT CTGCAAGCCC GCTGTGTATA CTTTAGTTCC TTCTAAATCT  
3181 GCCTTATACA TCTTATAATC ATACGGAAGA GACGCATTGT AAAGGTGCAT CAAAGGATCG  
3241 GTTTCACCAG TGAATCTCCC ACCCCATAGT TTTTGAGTGC CGTCTGACAT GTTTGCCTTA  
3301 GTCTTGTTAT ATACTGCTTT TGAGCTCTTC AATTGCGAAT ATTCTCCCCT AGCTAAAGAA  
3361 AGGTAGTCTT ATCTCAGAGT TCTGTGCTTC GCTGACCTTT TATAATCCTT TTTTTTTTTT

3421 TTCACATGTT TCAATTTGCG CCAGCTTATC CAAAAAGTGA GTCATTCATC TACTAATCAT  
3481 GATTTTCGGG ATTCTGCCAA TGAGTAACCA CCACAAGAAC GAACAAATAA TCGAAAAAAA  
3541 AAAACTGTTC TAGGCCAGAT ATGATGGAGC CTTGGCAGAT CAGGTTATTT GATTGTGCTT  
3601 AACAGAGGGT TTGGAAGAGT AAAGAAAAAT TAATTGCCTG CGCCAACCAT TTATTGTTAT  
3661 AACGCTAATT CTTGAATAAA TCAATGAATA ATTAGAGAGA GGGAGGAACG TAAATATTAA  
3721 TCGGTATAAA TATTTGTATA TATGTGAGCG CTCACGTACT CTTCAGTAAC TAAAGATCAT  
3781 GGCTTACATC TACCGCTGAA ACGTGGATAC AAGGAACAGT CTCTGACAGT GAATCTGTCA  
3841 CACAACCAGG CTAAAATACG TTCGGTACCG ATACCGTAAC CACCATGTGG GCAAGTACCG  
3901 TATTTTCTTT GGTCAATGAA CCAGTAGTAG GCGTCGGTAT CAATACCCTC ACGCTTAAAC  
3961 CCTGCCATTA GTTCGTCCAT GTCGTGCGATT CTCATAGAAC CACCAGTGAT TTCACCAACG  
4021 TTTGGCATCA AAACGTGCGC **AAAATTATTG TCGAAGACGG AAGAGCTGCT GCTGTTAGAA**  
4081 **CCGTTCCAAG CAAGCCTTTG AACCCAAAGA AGCCAAGTCA CAAGATCTAC CGTGCTAGAA**  
4141 **AGCAAATCGT TTTGTCTTGT GGTACCATCT CCTCTCCATT GGTTTTGCAA AGATCCGGTT**  
4201 **TTGGTGACCC AATCAAGTTG AGAGCCGCTG GTGTTAAGCC TTTGGTCAAC TTGCCAGGTG**  
4261 **TCGGAAGAAA CTTCCAAGAC CACTACTGTT TCTTCAGTCC TTACAGAATC AAGCCTCAGT**  
4321 **ACGAGTCTTT CGATGACTTC GTCCGTGGTG ATGCTGAGAT TCAAAAGAGA GTCTTTGACC**  
4381 **AATGGTACGC CAATGGTACT GGTCTCTTTG CCACTAACGG TATCGAAGCT GGTGTCAAGA**  
4441 **TCAGACCAAC ACCAGAAGAA CTCTCTCAA TGGACGAATC CTTCCAGGAG GGTTACAGAG**  
4501 **AATACTTCGA AGACAAGCCA GACAAGCCAG TTATGCACTA CTCCATCATT GCTGGTTTTCT**  
4561 **TCGGTGACCA CACCAAGATT CCTCCTGGAA AGTACATGAC TATGTTCCAC TTCTTGGAAT**  
4621 **ACCCATTCTC CAGAGGTTCC ATTCACATTA CCTCCCAGA CCCATACGCA GCTCCAGACT**  
4681 **TCGACCCAGG TTTTCATGAAC GATGAAAGAG ACATGGCTCC TATGGTTTTGG GCTTACAAGA**  
4741 **AGTCTAGAGA AACCGCTAGA AGAATGGACC ACTTTGCCGG TGAGGTCACT TCTCACCACC**  
4801 **CTCTGTTCCC ATACTCATCC GAGGCCAGAG CCTTGAAAT GGATTTGGAG ACCTCTAATG**  
4861 **CCTACGGTGG ACCTTTGAAC TTGTCTGCTG GTCTTGCTCA CGGTTCTTGG ACTCAACCTT**  
4921 **TGAAGAAGCC AACTGCAAAG AACGAAGGCC ACGTTACTTC GAACCAGGTC GAGCTTCATC**  
4981 **CAGACATCGA GTACGATGAG GAGGATGACA AGGCCATTGA GAACTACATT CGTGAGCACA**  
5041 **CTGAGACCAC ATGGCACTGT CTGGGAACCT GTTCCATCGG TCCAAGAGAA GGTTCCAAGA**  
5101 **TCGTCAAATG GGGTGGTGTT TTGGACCACA GATCCAACGT TTACGGAGTC AAGGGCTTGA**  
5161 **AGGTTGGTGA CTTGTCCGTG TGCCCAGACA ATGTTGGTTG TAACACCTAC ACCACCGCTC**  
5221 **TTTTGATCGG TGAAAAGACT GCCACTTTGG TTGGAGAAGA TTTAGGATAC TCTGGTGAGG**  
5281 **CCTTAGACAT GACTGTTCCCT CAGTTCAAGT TGGGCACTTA CGAGAAGACC GGTCTTGCTA**  
5341 **GATTCTAATC AAGAGGATGT CAGAATGCCA TTTGCCTGAG AGATGCAGGC TTCATTTTTG**  
5401 **ATACTTTTTT ATTTGTAACC TATATAGTAT AGGATTTTTT TTGTCATTTT GTTTCTTCTC**  
5461 **GTACGAGCTT GTCCTGATC AGCCTATCTC GCAGCTGATG AATATCTTGT GGTAGGGGTT**  
5521 **TGGGAAAATC ATTCGAGTTT GATGTTTTTC TTGGTATTTT CCACTCCTCT TCAGAGTACA**  
5581 **GAAGATTAAG TGAGACGTTT GTTTGTGCAA GCTT**

## Diferencias entre los P<sub>GAP</sub> de las secuencias LAC4 y LAC12

Se analizaron las secuencias de los promotores GAP de cuatro fuentes: nativo, plásmido pGAPZ $\alpha$ A, LAC4 y LAC12. La secuencia de la región comprendida entre el sitio de unión del primer pGAPF y el codón de inicio es diferente entre el P<sub>GAP</sub> empleado en el plásmido pGAPZ $\alpha$ A (Secuencia: [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast\\_plasmids&plasmid=pGAPZ\(alpha\)\\_A](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=pGAPZ(alpha)_A)) y el P<sub>GAP</sub> nativo de las cepas de *P. pastoris* GS115 (GenBank: CP014716.1), CBS 7435 (GenBank: LT962477.1) y WT (GenBank: CP014709.1). Esta misma región en los P<sub>GAP</sub> de LAC4 y LAC12 es distinta debido a la estrategia de construcción del plásmido, ya que el de LAC12 presenta el sitio de restricción de SfuI, al igual que el P<sub>GAP</sub> de pGAPZ $\alpha$ A. Los cambios en los nucleótidos cercanos al codón de inicio en LAC4 y LAC12 corresponden a las modificaciones para añadir secuencias Kozak. Las diferencias descritas se muestran en la **Tabla 101**.

**Tabla 101.** Diferencias entre los P<sub>GAP</sub> de distintos orígenes.

Origen del P <sub>GAP</sub>	Secuencia desde el sitio de unión del primer pGAPF hasta el codón de inicio
Nativo	<i>GTCCCTATTTCAATCAATTGAACA</i> ACTAT---CAAACACA <b>ATG</b>
pGAPZ $\alpha$ A	<i>GTCCCTATTTCAATCAATTGAACA</i> ACTATTT <b>CGAAA</b> ---CG <b>ATG</b>
LAC4	<i>GTCCCTATTTCAATCAATTGAACA</i> ACTAT-----AACAAA <b>ATG</b>
LAC12	<i>GTCCCTATTTCAATCAATTGAACA</i> ACTATTT <b>CGAAA</b> A <b>CAAAA</b> <b>ATG</b>

*Cursiva:* Sitio del primer pGAPF. **Negritas:** Codón de inicio. Subrayado: Sitio de restricción SfuI.

El resto de la secuencia del promotor es idéntica entre los 4 orígenes de la secuencia comparados, salvo por una modificación en el sitio de restricción de AvrII en la secuencia del P<sub>GAP</sub> de LAC4, en donde la secuencia original 5'-CCTAGG-3' se substituyó por 5'-CCTAGC-3' para evitar generar dos cortes al momento de linealizar el plásmido pGAP-LAC412 para la transformación de *P. pastoris*.

## Mapa del plásmido pGAPZ-LAC412

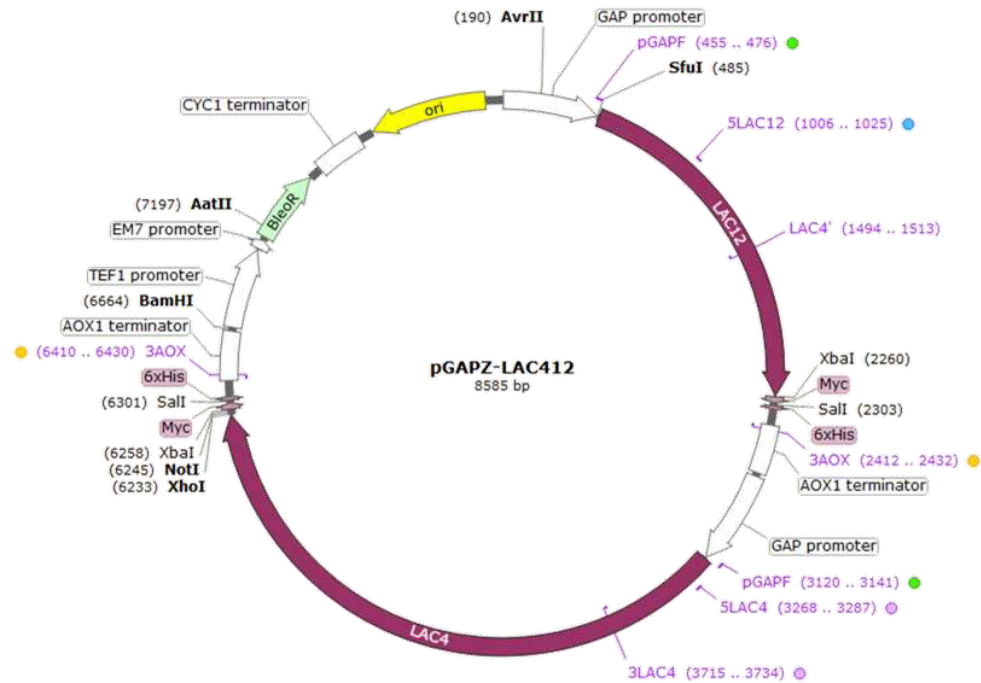


Figura 103. Mapa del plásmido pGAPZ-LAC412.

### Regiones y ubicación en pb

- $P_{GAP}$  de *LAC12*: 7-495
- Secuencia codificante de lactosa permeasa (*LAC12*) (primer bloque en negritas): 496-2259
- Terminador de *AOX1* de *LAC12*: 2406-2652
- $P_{GAP}$  de *LAC4*: 2672-3154
- Secuencia codificante de  $\beta$ -galactosidasa (*LAC4*) (segundo bloque en negritas): 3155-6232
- Terminador de *AOX1* de *LAC4*: 6404-6650
- Promotor *TEF1*: 6671-7078
- Promotor *EM7*: 7085-7132
- Gen de resistencia a zeocina (*Bleo<sup>R</sup>*): 7151-7525
- Terminador *CYC1*: 7591-7838
- Origen de replicación: 7913-8501

## Secuencia

1 AGATCTTTTT TGTAGAAATG TCTTGGTGTC CTCGTCCAAT CAGGTAGCCA TCTCTGAAAT  
 61 ATCTGGCTCC GTTGCAACTC CGAACGACCT GCTGGCAACG TAAAATTCTC CGGGGTAAAA  
 121 CTTAAATGTG GAGTAATGGA ACCAGAAACG TCTCTTCCCT TCTCTCTCCT TCCACCGCCC  
 181 GTTACCGTCC CTAGGAAATT TTAGTCTGCT GGAGAGCTTC TTCTACGGCC CCCTTGCAGC  
 241 AATGCTCTTC CCAGCATTAC GTTGCGGGTA AAACGGAGGT CGTGTACCCG ACCTAGCAGC  
 301 CCAGGGATGG AAAAGTCCCG GCCGTCGCTG GCAATAATAG CGGGCGGACG CATGTCATGA  
 361 GATTATTGGA AACCACCAGA ATCGAATATA AAAGGCGAAC ACCTTTCCCA ATTTTGGTTT  
 421 CTCCTGACCC AAAGACTTTA AATTTAATTT ATTTGTCCCT ATTTCAATCA ATTTGAACAAC  
 481 TATTTTCGAAA AAAAAATGGC **TGATCATTCT TCTTCTTCTT CTTCTTTGCA AAAGAAACCA**  
**541 ATCAATACTA TTGAACATAA AGATACTTTG GGAAATGATA GAGATCATAA AGAAGCTTTG**  
**601 AACTCTGATA ATGATAACAC TTCTGGATTG AAAATCAATG GAGTTCCAAT TGAAGATGCT**  
**661 AGAGAAGAAG TTTTGTGGCC AGGATACTTG TCTAAACAAT ACTACAAATT GTATGGATTG**  
**721 TGTTTCATTA CTTACTTGTG TGCTACTATG CAAGGATATG ATGGAGCTTT GATGGGATCT**  
**781 ATCTATACTG AAGATGCTTA CTTGAAATAC TATCATTTGG ATATCAACTC TTCTTCTGGA**  
**841 ACTGGATTGG TTTTCTCTAT CTTTAAACGTT GGACAAATCT GTGGAGCTTT CTTTGTTCCTA**  
**901 TTGATGGATT GGAAAGGAAG AAAACCAGCT ATCTTGATTG GATGTTTGGG AGTTGTTATT**  
**961 GGAGCTATCA TTTCTTCTTT GACTACTACT AAATCTGCTT TGATTGGAGG AAGATGGTTTT**  
 1021 GTTGCTTTTCT TTGCTACTAT TGCTAATGCT GCTGCTCCAA CTTATTGTGC TGAAGTTGCT  
 1081 CCAGCTCATT TGAGAGGAAA AGTTGCTGGA TTGTACAATA CTTTGTGGTC TGTTGGATCT  
 1141 ATTGTTGCTG CTTTTTCTAC TTATGGAAC TAAACAAAAC TTCCAAATTC TTCTAAAGCT  
 1201 TTCAAGATTC CATTGTATTT GCAAATGATG TTTCCAGGAT TGGTTTGTAT CTTTGGATGG  
 1261 TTGATTCCAG AATCTCCAAG ATGGTTGGTT GGAGTTGGAA GAGAAGAAGA AGCTAGAGAG  
 1321 TTCATTATCA AATACCATTT GAATGGAGAT AGAACTCATC CATTGTTGGA TATGGAAATG  
 1381 GCTGAAATCA TTGAATCTTT TCATGGAAC GATTTGTCTA ATCCATTGGA AATGTTGGAT  
 1441 GTTAGATCAT TGTTTAGAAC TAGATCAGAT AGATATAGAG CTATGTTGGT TATCTTGATG  
 1501 GCTTGGTTTTG GACAATTCTC TGGAAACAAT GTTTGTTCTT ACTACTTGCC AACTATGTTG  
 1561 AGAAATGTTG GAATGAAATC TGTTTCTTTG AATGTTTTGA TGAATGGAGT TTACTCTATT  
 1621 GTTACTTGGA TTTCTTCTAT TTGTGGAGCT TTCTTCATTG ATAAGATTGG AAGAAGAGAA  
 1681 GGATTCTTGG GATCTATTTT TGGAGCTGCT TTGGCTTTGA CTGGATTGTC TATTTGTACT  
 1741 GCTAGATATG AAAAGACTAA GAAAAAGTCT GCTTCTAATG GAGCTTTGGT TTTTCAATTC  
 1801 TTGTTTGGAG GAATCTTTTC TTTTGTCTTT ACTCCAATGC AATCTATGTA TTCTACTGAA  
 1861 GTTTCTACTA ACTTGACTAG ATCAAAAGCT CAATTGTTGA ACTTTGTTGT TTCTGGAGTT  
 1921 GCTCAATTTG TTAATCAATT TGCTACTCCA AAAGCTATGA AAAACATTA GTATTGGTTT  
 1981 TACGTTTTCT ATGTTTTCTT TGATATTTTC GAGTTTATTG TTATCTATTT CTTTTTCGTT  
 2041 GAAACTAAAG GAAGATCATT GGAAGAATTG GAAGTTGTTT TTGAAGCTCC AAATCCAAGA  
 2101 AAAGCTTCTG TTGATCAAGC TTTCTTGGCT CAAGTTAGAG CTACTTTGGT TCAAAGAAAT  
 2161 GATGTTAGAG TTGCTAATGC TCAAAACTTG AAAGAACAAG AACCATTGAA ATCTGATGCT  
 2221 GATCATGTTG AAAAGTTGTC TGAAGCTGAA TCTGTTTAA CTAGAACAAA AACTCATCTC  
 2281 AGAAGAGGAT CTGAATAGCG CCGTCGACCA TCATCATCAT CATCATTGAG TTTGTAGCCT  
 2341 TAGACATGAC TGTTCCCTCAG TTCAAGTTGG GCACTTACGA GAAGACCGGT CTTGCTAGAT  
 2401 TCTAATCAAG AGGATGTCAG AATGCCATTT GCCTGAGAGA TGCAGGCTTC ATTTTGTATA  
 2461 CTTTTTTTATT TGTAACCTAT ATAGTATAGG ATTTTTTTTTG TCATTTTGT TCTTCTCGTA  
 2521 CGAGCTTGCT CCTGATCAGC CTATCTCGCA GCTGATGAAT ATCTTGTGGT AGGGGTTTGG  
 2581 GAAAATCATT CGAGTTTGAT GTTTTTCTTG GTATTTCCCA CTCCTCTTCA GAGTACAGAA  
 2641 GATTAAGTGA GACCTTCGTT TGTGCGGATC TTTTTTGTAG AAATGTCTTG GTGTCCTCGT  
 2701 CCAATCAGGT AGCCATCTCT GAAATATCTG GCTCCGTTGC AACTCCGAAC GACCTGCTGG  
 2761 CAACGTAAAA TTCTCCGGGG TAAAACHTAA ATGTGGAGTA ATGGAACCAG AAACGTCTCT  
 2821 TCCCTTCTCT CTCCTTCCAC CGCCCGTTAC CGTCCCTAGC AAATTTTACT CTGCTGGAGA  
 2881 GCTTCTTCTA CGGCCCCCTT GCAGCAATGC TCTTCCCAGC ATTACGTTGC GGGTAAAACG  
 2941 GAGGTCGTGT ACCCGACCTA GCAGCCAGG GATGGAAAAG TCCCGGCCGT CGCTGGCAAT  
 3001 AATAGCGGGC GGACGCATGT CATGAGATTA TTGGAAACCA CCAGAATCGA ATATAAAAAG  
 3061 CGAACACCTT TCCCAATTTT GGTTCCTCCT GACCCAAAGA CTTTAAATTT AATTTATTTG  
 3121 TCCCTATTTT AATCAATTGA ACAACTATAA CAAAATGGCT **TGTTTTGATT CAGAAAACCT**  
**3181 GAGAAATCCA AAGAAAGTTC ATGAAAACAG ATTGCCAAC AGAGCTTACT ACTATGATCA**



3241 AGATATCTTT GAATCCTTGA ATGGACCATG GGCTTTTGCT TTGTTTGATG CTCCATTGGA  
3301 TGCTCCAGAT GCTAAGAATT TGGATTGGGA AACTGCTAAG AAATGGTCTA CTATTTCTGT  
3361 TCCATCTCAT TGGGAATTGC AAGAAGATTG GAAGTATGGA AAACCAATCT ATACTAATGT  
3421 TCAATATCCA ATTCCAATTG ATATTCCAAA TCCACCAACT GTTAATCCAA CTGGAGTTTA  
3481 TGCTAGAACT TTTGAATTGG ATTCTAAATC TATTGAATCT TTTGAACATA GATTGAGATT  
3541 TGAAGGAGTT GATAACTGTT ATGAATTGTA TGTTAATGGA CAATATGTTG GATTCAACAA  
3601 AGGATCAAGA AATGGAGCTG AATTTGATAT TCAAAAAGTAT GTTTCTGAAG GAGAAAACCT  
3661 GGTGTGTTGTT AAAGTTTTCA AATGGTCTGA TTCTACTTAC ATTGAAGATC AAGATCAATG  
3721 GTGGTTGTCT GGAATCTATA GAGATGTTTC TTTGTTGAAA TTGCCAAAAGA AAGCTCATAT  
3781 TGAAGATGTT AGAGTTACTA CTACTTTTTGT TGATTCTCAA TATCAAGATG CTGAATTGTC  
3841 TGTTAAAGTT GATGTTCAAG GATCTTCTTA TGATCATATC AATTTCACTT TGTATGAACC  
3901 AGAAGATGGA TCTAAAGTTT ATGATGCTTC TTCTTTGTTG AATGAAGAAA ATGGAAATAC  
3961 TACTTTTTTCT ACTAAAGAGT TCATTTCTTT TTCTACTAAG AAGAATGAAG AAAGTCTTTT  
4021 CAAAATCAAT GTTAAAGCTC CAGAACATTG GACTGCTGAA AATCCAACCT TGTATAAGTA  
4081 TCAATTGGAT TTGATTGGAT CTGATGGATC TGTTATTCAA TCTATCAAAC ATCATGTTGG  
4141 ATTTAGACAA GTTGAATTGA AAGATGGAAA CATTACTGTT AATGGAAAAG ATATCTTGTT  
4201 TAGAGGAGTT AACAGACATG ATCATCATCC AAGATTTGGA AGAGCTGTTT CATTGGATTT  
4261 TGTTGTTAGA GATTTGATTT TGATGAAGAA ATTCAATATC AATGCTGTTA GAAATTCTCA  
4321 TTATCCAAAT CATCCAAAAG TTTATGATTT GTTTGATAAG TTGGGATTTT GGGTTATTGA  
4381 TGAAGCTGAT TTGGAAACTC ATGGAGTTCA AGAACCATT C AATAGACATA CTAAGTTGGA  
4441 AGCTGAATAT CCAGATACTA AGAACAAATT GTATGATGTT AATGCTCATT ACTTGTCTGA  
4501 TAATCCAGAA TATGAAGTTG CTTACTTGGA TAGAGCTTCT CAATTGGTTT TGAGAGATGT  
4561 TAATCATCCA TCTATCATT TCTGGTCTTT GGGAAATGAA GCTTGTTATG GAAGAAATCA  
4621 TAAAGCTATG TATAAGTTGA TTAAGCAATT GGACCCAAC AGATTGGTTC ATTATGAAGG  
4681 AGATTTGAAT GCTTTGTCTG CTGATATCTT TTCTTTCATG TATCCAACCT TTGAAATCAT  
4741 GGAAGATGG AGAAAAGATC ATACTGATGA AAATGGAAAG TTTGAAAACAT CATTGATTTT  
4801 GTGTGAATAT GGACATGCTA TGGGAAATGG ACCAGGATCT TTGAAAGAA ATCAAGAATT  
4861 GTTTTACAAA GAAAAGTCT ATCAAGGAGG ATTCATTTGG GAATGGGCTA ATCATGGAAT  
4921 TGAATTTGAA GATGTTTCTA CTGCTGATGG AAAGTTGCAT AAAGCTTATG CTTATGGAGG  
4981 AGATTTCAAA GAAGAAGTTC ATGATGGAGT TTTTATTATG GATGGATTGT GTAATTCTGA  
5041 ACATAATCCA ACTCCAGGAT TGTTTGAATA CAAGAAAGTT ATTGAACCAG TTCATATCAA  
5101 GATTGCTCAT GGATCTGTTA CTATTACTAA CAAACATGAT TTCATTACTA CTGATCATT  
5161 GTTGTTTCAAT GATAAAGATA CTGGAAAAAC TATTGATGTT CCATCTTTGA AACCAGAAGA  
5221 ATCTGTTACT ATTCCATCTG ATACTACTTA TGTTGTTGCT GTTTTGAAG ATGATGCTGG  
5281 AGTTTTGAAA GCTGGACATG AAATTGCTTG GGGACAAGCT GAATTGCCAT TGAAAGTTCC  
5341 AGATTTTGTT ACTGAAACTG CTGAAAAAGC TGCTAAGATC AATGATGGAA AAAGATATGT  
5401 TTCTGTTGAA TCTTCTGGAT TGCATTTTAT TTTGGATAAG TTGTTGGGAA AGATTGAATC  
5461 TTTGAAAGTT AAAGGAAAAG AAATCTCTTC TAAGTTTGAA GGATCTTCTA TTACTTTTTG  
5521 GAGACCACCA ACTAACAATG ATGAACCAAG AGATTTCAAG AATTGGAAGA AATACAACAT  
5581 TGATTTGATG AAACAAAACA TTCATGGAGT TTCTGTTGAA AAAGGATCTA ATGGATCTTT  
5641 GGCTGTTGTT ACTGTTAACT CAAGAATTTT TCCAGTTGTT TTCTACTATG GATTTGAAAC  
5701 TGTTCAAAAAG TATACTATCT TTGCTAACAA GATTAACCTG AATACTTCTA TGAAATTGAC  
5761 TGGAGAATAT CAACCACCAG ATTTTCCAAG AGTTGGATAT GAGTCTGGT TGGGAGATTC  
5821 TTATGAATCT TTTGAATGGT TGGGAAGAGG ACCAGGAGAA TCTTATCCAG ATAAGAAAGA  
5881 ATCTCAAAGA TTTGGATTGT ATGATTTCTAA AGATTTGAA GAATTTGTTT ATGATTATCC  
5941 ACAAGAAAAT GGAAATCATA CTGATACTCA TTTCTTGAAT ATCAAATTCG AGGGAGCTGG  
6001 AAAGTTGTCT ATCTTTCAAA AAGAAAAACC ATTCATTTTC AAGATTTCTG ATGAATATGG  
6061 AGTTGATGAA GCTGCTCATG CTTGTGATGT TAAGAGATAT GGAAGACATT ACTTGAGATT  
6121 GGATCATGCT ATTCATGGAG TTGGATCTGA AGCTTGTGGA CCAGCTGTTT TGGATCAATA  
6181 CAGATTGAAA GCTCAAGATT TCAATTTCTGA GTTTGATTTG GCTTTTGAAT AACTCGAGCC  
6241 GCGGCGGCCG CCAGCTTTCT AGAACAAAAA CTCATCTCAG AAGAGGATCT GAATAGCGCC  
6301 GTCGACCATC ATCATCATCA TCATTGAGTT TGTAGCCTTA GACATGACTG TTCCTCAGTT  
6361 CAAGTTGGGC ACTTACGAGA AGACCGGTCT TGCTAGATTC TAATCAAGAG GATGTCAGAA  
6421 TGCCATTTGC CTGAGAGATG CAGGCTTCAT TTTTGATACT TTTTTATTTG TAACCTATAT  
6481 AGTATAGGAT TTTTTTTGTC ATTTTGTTC TTCTCGTACG AGCTTGCTCC TGATCAGCCT  
6541 ATCTCGCAGC TGATGAATAT CTTGTGGTAG GGGTTTGGGA AAATCATTCC AGTTTGATGT  
6601 TTTTCTTGGT ATTTCCACT CCTCTTCAGA GTACAGAAGA TTAAGTGAGA CCTTCGTTTG

6661 TGC GGATCCC CCACACACCA TAGCTTCAAA ATGTTTCTAC TCCTTTTTTTA CTCTTCCAGA  
6721 TTTTCTCGGA CTCCGCGCAT CGCCGTACCA CTTCAAAAACA CCCAAGCACA GCATACTAAA  
6781 TTTCCCCTCT TTCTTCTCTT AGGGTGTTCGT TAATTACCCG TACTAAAGGT TTGGAAAAGA  
6841 AAAAAGAGAC CGCCTCGTTT CTTTTTCTTC GTCGAAAAAG GCAATAAAAA TTTTTATCAC  
6901 GTTTTCTTTTT CTTGAAAATT TTTTTTTTTG ATTTTTTTTCT CTTTCGATGA CCTCCCATTG  
6961 ATATTTAAGT TAATAAACGG TCTTCAATTT CTCAAGTTTC AGTTTCATTT TTCTTGTTCT  
7021 ATTACAACCT TTTTACTTTC TTGCTCATTG GAAAGAAAGC ATAGCAATCT AATCTAAGGG  
7081 CGGTGTTGAC AATTAATCAT CGGCATAGTA TATCGGCATA GTATAATACG ACAAGGTGAG  
7141 GAACTAAACC ATGGCCAAGT TGACCAGTGC CGTTCGGTG CTCACCGCGC GCGACGTCCG  
7201 CGGAGCGGTC GAGTTCTGGA CCGACCGGCT CGGGTTCTCC CGGGACTTCG TGGAGGACGA  
7261 CTTGCCCGGT GTGGTCCGGG ACGACGTGAC CCTGTTTCATC AGCGCGGTCC AGGACCAGGT  
7321 GGTGCCGGAC AACACCCTGG CCTGGGTGTG GGTGCGCGGC CTGGACGAGC TGTACGCCGA  
7381 GTGGTCGGAG GTCGTGTCCA CGAACTTCCG GGACGCCTCC GGGCCGGCCA TGACCGAGAT  
7441 CGGCGAGCAG CCGTGGGGGC GGGAGTTCGC CCTGCGCGAC CCGGCCGGCA ACTGCGTGCA  
7501 CTTCGTGGCC GAGGAGCAGG ACTGACACGT CCGACGCGGC CCGACGGGTC CGAGGCCTCG  
7561 GAGATCCGTC CCCCTTTTCC TTTGTGATA TCATGTAATT AGTTATGTCA CGCTTACATT  
7621 CACGCCCTCC CCCCACATCC GCTCTAACCG AAAAGGAAGG AGTTAGACAA CCTGAAGTCT  
7681 AGGTCCCTAT TTATTTTTTT ATAGTTATGT TAGTATTAAG AACGTTATTT ATATTTCAAA  
7741 TTTTTCTTTT TTTTCTGTAC AGACGCGTGT ACGCATGTAA CATTATACTG AAAACCTTGC  
7801 TTGAGAAGGT TTTGGGACGC TCGAAGGCTT TAATTTGCAA GCTGGAGACC AACATGTGAG  
7861 CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTTCCATA  
7921 GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC  
7981 CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCTCTGTG CGCTCTCCTG  
8041 TTCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC  
8101 TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTGCTTCGC TCCAAGCTGG  
8161 GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC  
8221 TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAAACAGGA  
8281 TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG  
8341 GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA  
8401 AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTTG  
8461 TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT  
8521 CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTTG GTCATGCATG  
8581 AGATC

## Mapa del plásmido pCC1-b-Galgs

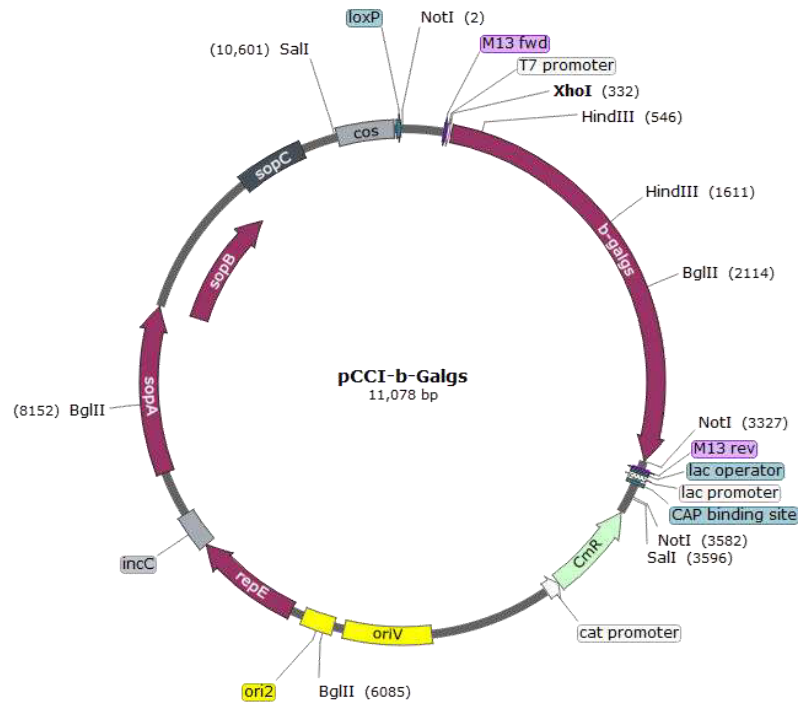


Figura 104. Mapa del plásmido pCC1-b-Galgs.

### Regiones y ubicación en pb

- Secuencia del gen sintético de  $\beta$ -galactosidasa (b-Galgs): 344-3325
- Gen de resistencia a cloranfenicol ( $Cm^R$ ): 3716-4375
- Promotor de gen de resistencia a cloranfenicol: 4376-4478
- Origen de replicación del plásmido F (oriV): 5336-5950
- Origen de replicación secundario del plásmido F (ori2): 6026-6245
- Proteína de inicio de replicación del plásmido F (repE): 6336-7091
- Región de incompatibilidad del plásmido F (incC): 7094-7344
- Proteína de partición del plásmido F (sopA): 7670-8845
- Proteína de partición del plásmido F (sopB): 8845-9816
- Región de partición tipo centrómero del plásmido F (sopC): 9889-10362
- Sitio cos de lambda: 10622-11020

La secuencia del plásmido pCC1-b-Galgs puede generarse con la secuencia de b-Galgs (ver plásmido pGAHbGalgs) y de pCC1 (acceso de GenBank: EU140750.1).

## Mapa y secuencia del plásmido pGAHbGalgs

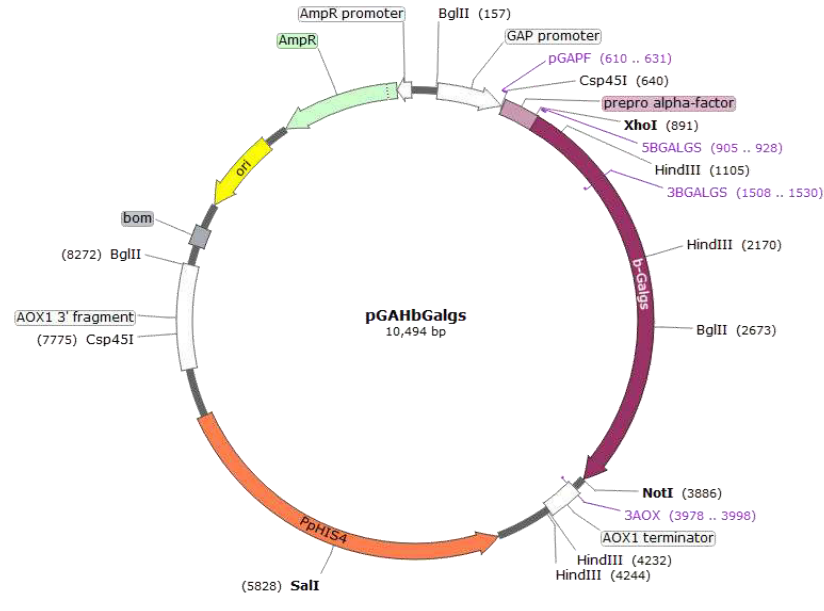


Figura 105. Mapa del plásmido pGAHbGalgs.

### Regiones y ubicación en pb

- Región del promotor *GAP*: 163-638
- Secuencias del factor alfa: 648-902
- Secuencia del gen sintético de  $\beta$ -galactosidasa (*b-Galgs*), en negritas: 903-3884
- Terminador AOX1: 3972-4218
- Gen de histidinol deshidrogenasa de *P. pastoris* (*PpHIS4*): 4631-7165
- Fragmento de 3' AOX1: 7520-8276
- Base de la región de movilidad de pBR322 (*bom*): 8419-8559
- Origen de replicación de alto número de copias de ColE1/pMB1/pBR322/pUC (*ori*): 8745-9333
- Gen de resistencia a ampicilina (*Amp<sup>R</sup>*): 9504 – 10364
- Promotor de gen de resistencia a ampicilina: 10365-10469

### Secuencia

```

1  GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG
61  CCCTTTCGTC TTCAAGAATT AATTCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAT AAGCTGACTC
121 ATGTTGGTAT TGTGAAATAG ACGCAGATCG GGAACAAGAT CTTTTTTGTA GAAATGTCTT
181 GGTGTCCTCG ACCAATCAGG TAGCCATCCC TGAAATACCT GGCTCCGTGG CAACACCGAA

```

241 CGACCTGCTG GCAACGTTAA ATTCTCCGGG GTAAACTTA AATGTGGAGT AATAGAACCA  
301 GAAACGTCTC TTCCCTTCTC TCTCCTTCCA CCGCCCCTTA CCGTCCCTAG GAAATTTTAC  
361 TCTGCTGGAG AGCTTCTTCT ACGGCCCCCT TGCAGCAATG CTCTTCCCAG CATTACGTTG  
421 CGGGTAAAAC GGAGGTCGTG TACCCGACCT AGCAGCCCAG GGATGGAAAG TCCCAGCCGT  
481 CGCTGGCAAT AACTGCGGGC GGACGCATGT CTTGAGATTA TTGGAAACCA CCAGAATCGA  
541 ATATAAAAGG CGAACACCTT TCCCAATTTT GGTTCCTCCT GACCCAAAGA CTTTAAATTT  
601 AATTTATTTG TCCCTATTTT AATCAATTGA ACAACTATTT CGAAACGATG AGATTTCCAT  
661 CTATCTTTAC TGCTGTTTTG TTTGCTGCTT CTTCTGCTTT GGCTGCTCCA GTTAACACTA  
721 CTAAGGAAGA TGAAACTGCT CAAATCCAG CTGAAGCTGT TATTGGATAT TCTGATTTGG  
781 AAGGAGATTT TGATGTTGCT GTTTTGCCAT TTTCTAATTC TACTAACAAT GGATGTTTGT  
841 TCATTAACAC TACTATTGCT TCTATTGCTG CTAAAGAAGA AGGAGTTTCT CTCGAGAAAA  
901 GAGCTGCTAT TTCTCATAAG TTGGATGGAT TTACTTTGAG AGAACATGCT GATGCTTCTA  
961 AAAGAGAATT GTTGCAAAAG TATGTTACTT GGGATAAACA TTCTATCTTT ATCAATGGAG  
1021 AAAGATTGAT GATGTTTTCT GGAGAAGTTC ATCCATATAG ATTGCCAGTT GCTTCTTTGT  
1081 ACATTGATGT TTTTGAAAAG ATCAAAGCTT TGGGATTCAA TTGTGTTTCT TTCTATGTTG  
1141 ATTGGGCTTT GTTGGAAGGA AAACCAGGAC ATTACACTGC TGAAGGAATC TTTGATTTGC  
1201 AACCATTCTT TGATGCTGCT AAAGAAGCTG GAATCTATTT GTTGGCTAGA CCAGGACCAT  
1261 ACATCAATGC TGAAGTTTCT GGAGGAGGAT TTCCAGGATG GTTGCAAAGA GTTAATGGAA  
1321 CTTTGAGAAC TTCTATTGGA GATTACTTGA AATCTACTGA TAACTATGCT TCTCATATTG  
1381 CTAAAACATAT TGCTAAAGCT CAAATCACTA ATGGAGGACC AATCATTTTG TATCAACCAG  
1441 AAAATGAATA CTCTGGAGCT TGTTGTGGAT ATGAAGATTT TCCAGATGGA TCTTACATGC  
1501 AATACATTGA AGATCATGCT AGAGATGCTG GAATTGTTGT TCCATTCTTT TCTAATGATG  
1561 CTTATGCTGG AGGACATAAT GCTCCAGGAA CTGGAAAAGG AGCTGTTGAT ATCTATGGAC  
1621 ATGATGGATA TCCATTGGGA TTTGATTGTG CTAATCCATC TGTTTGGCCA GATGGAAACT  
1681 TGCCAACATA CTATCATACT TTGCATGAAG AACAACTCTC AACTACTCCA TTTTCTGTTG  
1741 TTGAATTTCA AGGAGGAGCT TTTGATCCAT GGGGAGGAGT TGGATTTGCT AAATGTGCTC  
1801 ATTTGTTGAA TCATGAATTT GAAAGATTTT TCTATAAGAA TGATTTCTCT TTTGGAGTTA  
1861 CTTTCTTTAA CTTGTATATG ATCTTTGGAG GAACTAATTG GGGAAACTTG GGACATCCAG  
1921 GAGGATATAC TTCTTATGAT TATGGATCTG CTATTTCTGA ATCTAGAAAT GTTACTAGAG  
1981 AAAAGTATTC TGAATTGAAA TTGTTGGGAA ACTTTGCTAA AGTTTCTCCA GGATATGTTG  
2041 TTGCTAATCC AGGAAACTTG ACTACTTCTA AGTATACTAA AACTGCTGAT TTGACTGTTA  
2101 CTCCATTGTT GGGAGAATCT TCTTCTGCTG GATCTTTCTT TGTTATCAGA CATTCTAACT  
2161 ACAATTCTCA AGCTTCTGTT AAGTATCAAT TGACTTTGCC AACTTCTGCT GGAGAATTGA  
2221 CTATTCCACA ATTGGGAGGA GAATTGACTT TGTCTGGAAG AGATTCTAAG ATTCATGTTA  
2281 CTGATTATGA TGTTGCTGGA TCTAACATTT TGTATTCTAC TGCTGAAGTT TTCACTTGGA  
2341 AAAAGTTTGA TAATGGAAAA GTTTTGATTT TGTATGGAGG ACCAGGAGAA CATCATGAAT  
2401 TTGCTGTTAC TGGAGCTTCT GCTTCTTCTG TTATTGAAGG ATCTTCTTCT GGAATTACTT  
2461 CTAAGAAGAT TGGAGATGCT TTGGTTGTTG CTTGGGATGT TTCTTCTAAA AGAAGAATCA  
2521 TTAAGATTGG AGATTTGAAA GTTTTCTTGT TGGATAGAAA TTCTGCTTAC AATTACTGGG  
2581 TTCCACATTT GCCAACTAAA GGAAAAGCTC CAGGATATGT TTCTAAGAAA GCTATTGATT  
2641 CTTCTATCAT TGTTAAAGCT GGATACTTGG TTAGATCTGC TTTCTTGTCT GGAAAAGATT  
2701 TGCATATTCA AGCTGATTTT AATGCTACTA CTCCAATTGA AATCATTGGA GCTCCATCTT  
2761 CTGCTAAGAA TTTGGTTATC AATGGAAAGA AAATAAAAC TAATGTTGAT GATAATGGAA  
2821 TTTGGTCTGC TTCTGTTTCT TATTCTACTC CAGAAATTC A TTTGCCATCT TTGAAAGATT  
2881 TGAAATGGCA ATCTATTGAT ACTTTGCCAG AAGTTAAGAA TTCTTATGAT GATTCTGCTT  
2941 GGACTTCTGC TGATCAACCA CATACTTTGA ATACTGCTCA TGAATTGCAA ACTCCAACTA  
3001 CTTTGTTTTT TTCTGATTAT GGATATCATA CTGGAACTTT GTTGTATAGA GGACATTTTG  
3061 TTGCTAATGG AAAAGAATCT ATCTTTTTCA TTCAAACCTCA AGGAGGATCT GCTTATGGAC  
3121 ATTCTGTTTG GGTAAATGAA ACTTATGTTG GATCTTGGGA AGGATCTGGA TCTAATGATA  
3181 ACTACAATGC TACTTATACT TTGCCATCTT TGGCTACTGG AAAGAAGTAT GCTATTACTG  
3241 TTGTTATTGA TAACATGGGA TTGGATGTTA ACTGGGTTAT TGGACAAGAA GGAATGAAGA  
3301 ATCCAAGAGG AATCATTAGA TACAATTTGG CTGGACATGA TGCTTCTGCT ATTTCTTGGA  
3361 AATTGACTGG AAATTTGGGA GGAGAAGATT ACAGAGATAC TGTTAGAGGA CCATTGAATG  
3421 AAGGAGGATT GTATGCTGAA AGACAAGGAT TTCATCAACC AAAACCATCT ACTAAGAATT  
3481 GGGATTCTTC TTCTCCATTT ACTGGATTGA CTAAACCAGG AATTAGATTC TATTCTGCTT  
3541 CTTTTGATTT GGATTTGCCA TCTGGATATG ATATTCCATT GTACTTTAAC TTTGGAAATT  
3601 CTACTGCTCC ACCAGATGCT TATAGAGTTC AATTGTTTGT TAATGGATAT CAATATGGAA

**3661 AGTATGTTAA CAATGTTGGA CCACAACTT CTTTTCCAGT TCCAGAAGGA ATCTTGAAC**  
**3721 ATCATGGAAC TAATTGGATT GCTTTGTCTT TGTGGGCTCA ACAAGAATCT GGAGCTAAGT**  
**3781 TGAATCTTTT TGAATTGATT AACACTACTC CAGTTTTGAC TTCTTTGGAT AAAGTTAAGT**  
**3841 CTGTTGATCA ACCAAAGTAT AAGTCTAGAA AAGGAGCTTA TTAAGCGGCC** GCGAATTAAT  
3901 TCGCCTTAGA CATGACTGTT CCTCAGTTCA AGTTGGGCAC TTACGAGAAG ACCGGTCTTG  
3961 CTAGATTCTA ATCAAGAGGA TGTCAGAATG CCATTTGCCT GAGAGATGCA GGCTTCATTT  
4021 TTGATACTTT TTTATTTGTA ACCTATATAG TATAGGATTT TTTTGTGCAT TTTGTTTCTT  
4081 CTCGTACGAG CTTGCTCCTG ATCAGCCTAT CTCGCAGCTG ATGAATATCT TGTGGTAGGG  
4141 GTTTGGGAAA ATCATTGAGG TTTGATGTTT TTCTTGGTAT TTCCCCTCC TCTTCAGAGT  
4201 ACAGAAGATT AAGTGAGAAG TTCGTTTGTG CAAGCTTATC GATAAGCTTT TACTCGGTAG  
4261 TTTATCACAG TTAAATTGCT AACGCAGTCA GGCACCGTGT ATGAAATCTA ACAATGCGCT  
4321 CATCGTCATC CTCGGCACCG TCACCCTGGA TGCTGTAGGC ATAGGCTTGG TTATGCCGGT  
4381 ACTGCCGGGC CTCTTGCGGG ATATCGTCCA TTCCGACAGC ATCGCCAGTC ACTATGGCGT  
4441 GCTGCTAGCG CTATATGCGT TGATGCAATT TCTATGCGCA CCCGTTCTCG GAGCACTGTC  
4501 CGACCGCTTT GGCCGCCGCC CAGTCCTGCT CGCTTCGCTA CTTGGAGCCA CTATCGACTA  
4561 CGCGATCATG GCGACCACAC CCGTCCTGTG GATCTATCGA ATCTAAATGT AAGTTAAAAT  
4621 CTCTAAATAA TTAAATAAGT CCCAGTTTCT CCATACGAAC CTTAACAGCA TTGCGGTGAG  
4681 CATCTAGACC TTCAACAGCA GCCAGATCCA TCACTGCTTG GCCAATATGT TTCAGTCCCT  
4741 CAGGAGTTAC GTCTTGTGAA GTGATGAACT TCTGGAAGGT TGCAGTGTTA ACTCCGCTGT  
4801 ATTGACGGGC ATATCCGTAC GTTGGCAAAG TGTGGTTGGT ACCGGAGGAG TAATCTCCAC  
4861 AACTCTCTGG AGAGTAGGCA CCAACAAACA CAGATCCAGC GTGTTGTACT TGATCAACAT  
4921 AAGAAGAAGC ATTCTCGATT TGCAGGATCA AGTGTTCAGG AGCGTACTGA TTGGACATTT  
4981 CCAAAGCCTG CTCGTAGGTT GCAACCGATA GGGTTGTAGA GTGTGCAATA CACTTGCFTA  
5041 CAATTTCAAC CCTTGGCAAC TGCACAGCTT GGTTGTGAAC AGCATCTTCA ATTCTGGCAA  
5101 GTCCTTGTG TGTCAATATCG ACAGCCAACA GAATCACCTG GGAATCAATA CCATGTTTCTG  
5161 CTTGAGACAG AAGGTCTGAG GCAACGAAAT CTGGATCAGC GTATTTATCA GCAATAACTA  
5221 GAATTTTCTGAGG GGCAGCAGTA ACGAATCTGTA TACTACACAG GGCTGATGTG TCATTTTGAA  
5281 CCATCATCTT GGCAGCAGTA ACGAATCTGTA TACTACACAG GGCTGATGTG TCATTTTGAA  
5341 GAACAGTTTC TGTTCCGTAA GCCATAGCAG CTAAGTCTGTT GGCCTCCTCT GCTAGCACGA  
5401 TACACTTAGC ACCAACCTTG TGGGCAACGT AGATGACTTC TGGGGTAAGG GTACCATCCT  
5461 TCTTAGGTGG AGATGCAAAA ACAATTTCTT TGCAACCAGC AACTTTGGCA GGAACACCCA  
5521 GCATCAGGGA AGTGAAGGC AGAATTGCGG TTCCACCAGG AATATAGAGG CCAACTTTCT  
5581 CAATAGGTCT TGCAAAACGA GAGCAGACTA CACCAGGGCA AGTCTCAACT TGCAACGTCT  
5641 CCGTTAGTTG AGCTTCATGG AATTTCTGTA CGTTATCTAT AGAGAGATCA ATGGCTCTCT  
5701 TAACGTTATC TGGCAATTGC ATAAGTTCCT CTGGGAAAGG AGCTTCTAAC ACAGGTGTCT  
5761 TCAAAGCGAC TCCATCAAAC TTGGCAGTTA GTTCTAAAAG GGCTTTGTCA CCATTTTGAC  
5821 GAACATTGTC GACAATTGGT TTGACTAATT CCATAATCTG TTCCGTTTTT TGGATAGGAC  
5881 GACGAAGGGC ATCTTCAATT TCTTGTGAGG AGGCCTTAGA AACGTCAATT TTGCACAATT  
5941 CAATACGACC TTCAGAAGGG ACTTCTTTAG GTTTGGATTC TTCTTTAGGT TGTTCTTTGG  
6001 TGTATCCTGG CTTGGCATCT CTTTCTCTTC TAGTGACCTT TAGGGACTTC ATATCCAGGT  
6061 TTCTCTCCAC CTCGTCCAAC GTCACACCGT ACTTGGCACA TCTAACTAAT GCAAAATAAA  
6121 ATAAGTCAGC ACATTCCCAG GCTATATCTT CCTTGGATTT AGCTTCTGCA AGTTCATCAG  
6181 CTTCTCCTCT AATTTTAGCG TTCAACAAAA CTTCTGTCGTC AAATAACCGT TTGGTATAAG  
6241 AACCTTCTGG AGCATTGCTC TTACGATCCC ACAAGGTGGC TTCCATGGCT CTAAGACCCT  
6301 TTGATTGGCC AAAACAGGAA GTGCGTTCCA AGTGACAGAA ACCAACACCT GTTTGTTCAA  
6361 CCACAAATTT CAAGCAGTCT CCATCACAAT CCAATTCGAT ACCCAGCAAC TTTTGTGTTG  
6421 CTCCAGATGT AGCACCTTTA TACCACAAAC CGTGACGACG AGATTGGTAG ACTCCAGTTT  
6481 GTGTCCTTAT AGCCTCCGGA ATAGACTTTT TGGACGAGTA CACCAGGCCC AACGAGTAAT  
6541 TAGAAGAGTC AGCCACCAA GTAGTGAATA GACCATCGGG GCGGTGAGTA GTCAAAGACG  
6601 CCAACAAAT TTTACTGACA GGGAATTTT TGACATCTTC AGAAAGTTTC TATTAGTAG  
6661 TCAATTGCCG AGCATCAATA ATGGGGATTA TACCAGAAGC AACAGTGGAA GTCACATCTA  
6721 CCAACTTTGC GGTCTCAGAA AAAGCATAAA CAGTTCTACT ACCGCCATTA GTGAACTTT  
6781 TCAAATCGCC CAGTGGAGAA GAAAAAGGCA CAGCGATACT AGCATTAGCG GGCAAGGATG  
6841 CAACTTTATC AACCAGGGTC CTATAGATAA CCCTAGCGCC TGGGATCATC CTTTGGACAA  
6901 CTCTTTCTGC CAAATCTAGG TCCAAAATCA CTTTATTGAT ACCATTATTG TACAACCTGA  
6961 GCAAGTTGTC GATCAGCTCC TCAAATGGT CCTCTGTAAC GGATGACTCA ACTTGCACAT  
7021 TAACTTGAAG CTCAGTCGAT TGAGTGAAC TGATCAGGTT GTGCAGCTGG TCAGCAGCAT

7081 AGGGAAACAC GGCTTTTCCT ACCAAACTCA AGGAATTATC AAACCTCTGCA ACACTTGCGT  
7141 ATGCAGGTAG CAAGGGAAAT GTCATACTTG AAGTCGGACA GTGAGTGTAG TCTTGAGAAA  
7201 TTCTGAAGCC GTATTTTTAT TATCAGTGAG TCAGTCATCA GGAGATCCTC TACGCCGGAC  
7261 GCATCGTGGC CGGCATCACC GGCGCCACAG GTGCGGTTGC TGGCGCCTAT ATCGCCGACA  
7321 TCACCGATGG GGAAGATCGG GCTCGCCACT TCGGGCTCAT GAGCGCTTGT TTCGGCGTGG  
7381 GTATGGTGGC AGGCCCCGTG GCCGGGGGAC TGTTGGGCGC CATCTCCTTG CATGCACCAT  
7441 TCCTTGCGGC GCGGTGCTC AACGGCCTCA ACCTACTACT GGGCTGCTTC CTAATGCAGG  
7501 AGTCGCATAA GGGAGAGCGT CGAGTATCTA TGATTGGAAG TATGGGAATG GTGATACCCG  
7561 CATTCTTCAG TGTCTTGAGG TCTCCTATCA GATTATGCC AACTAAAGCA ACCGGAGGAG  
7621 GAGATTTTAT GGTAAATTTT TCTGACTTTT GGTTCATCAGT AGACTCGAAC TGTGAGACTA  
7681 TCTCGGTTAT GACAGCAGAA ATGTCCTTCT TGGAGACAGT AAATGAAGTC CCACCAATAA  
7741 AGAAATCCTT GTTATCAGGA ACAAACCTTCT TGTTTCGAAC TTTTTCGGTG CCTTGAACTA  
7801 TAAAATGTAG AGTGGATATG TCGGGTAGGA ATGGAGCGGG CAAATGCTTA CCTTCTGGAC  
7861 CTTCAAGAGG TATGTAGGGT TTGTAGATAC TGATGCCAAC TTCAGTGACA ACGTTGCTAT  
7921 TTCGTTCAAA CCATTCCGAA TCCAGAGAAA TCAAAGTTGT TTGTCTACTA TTGATCCAAG  
7981 CCAGTGCGGT CTTGAAACTG ACAATAGTGT GCTCGTGTTC TGAGGTCATC TTTGTATGAA  
8041 TAAATCTAGT CTTTGATCTA AATAATCTTG ACGAGCCAAG GCGATAAATA CCCAAATCTA  
8101 AAACCTTTTT AAAACGTTAA AAGGACAAGT ATGTCTGCCT GTATTAAACC CCCAAATCAGC  
8161 TCGTAGTCTG ATCCTCATCA ACTTGAGGGG CACTATCTTG TTTTAGAGAA ATTTGCGGAG  
8221 ATGCGATATC GAGAAAAAGG TACGCTGATT TTAAACGTGA AATTTATCTC AAGATCTCTG  
8281 CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT  
8341 CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG  
8401 TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC  
8461 TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA  
8521 ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC  
8581 ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG  
8641 GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC  
8701 CACGAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC ACGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC  
8761 CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA  
8821 CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC  
8881 CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCTTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAA  
8941 TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG  
9001 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC  
9061 AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA  
9121 GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT  
9181 AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT  
9241 GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG  
9301 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG  
9361 TCTGACGCTC AGTGAACGA AAACCTCAGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA  
9421 AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTA AAATGAAGTT TTAATCAAT CTAAAGTATA  
9481 TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG  
9541 ATCTGTCTAT TTCGTTTATC CATAGTTGCC TGAATCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA  
9601 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTACCCG  
9661 GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT  
9721 GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT  
9781 TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC  
9841 TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA  
9901 TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT  
9961 AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC  
10021 ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA  
10081 TAGTGTATGC GCGGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA  
10141 CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTCCGGGGCG AAAACTCTCA  
10201 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT  
10261 TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC  
10321 GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA  
10381 TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT  
10441 TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCT

### ANEXO 3. DATOS ADICIONALES (CULTIVOS DE INDUCCIÓN)

**Tabla 102.** Densidad celular de los cultivos (DO<sub>600 nm</sub>) al finalizar el cultivo de generación de biomasa y a 0, 24 y 48 h de inducción con metanol.

Cepa	Temperatura	Medio de generación de biomasa	Densidad celular a diferentes tiempos de inducción (DO <sub>600 nm</sub> )			
			Previo*	0 h	24 h	48 h
KM71FTEII-LAC	30 °C	BMG	8.81 ± 0.30	34.57 ± 0.42	40.97 ± 0.25	53.60 ± 2.29
		BMG (+ CaCl <sub>2</sub> )**	7.46 ± 0.44	28.93 ± 1.76	37.77 ± 1.64	46.10 ± 1.18
		BMLac	4.68 ± 0.12	23.77 ± 1.50	30.07 ± 1.03	43.03 ± 0.42
	24 °C	BMLac (+ CaCl <sub>2</sub> )	5.63 ± 0.26	27.07 ± 0.97	34.93 ± 0.91	44.93 ± 0.72
		BMG	3.42 ± 0.28	18.77 ± 1.52	27.97 ± 1.38	39.37 ± 2.05
		BMG (+ CaCl <sub>2</sub> )	4.02 ± 1.69	22.27 ± 11.47	31.40 ± 6.41	40.33 ± 4.91
KM71 HGH22K-LAC	30 °C	BMLac	3.82 ± 0.15	21.27 ± 1.20	27.73 ± 0.15	41.43 ± 0.47
		BMLac (+ CaCl <sub>2</sub> )	2.55 ± 0.95	14.00 ± 5.92	22.27 ± 6.56	36.33 ± 5.74
	24 °C	BMG	8.32 ± 0.72	32.30 ± 2.62	36.50 ± 4.77	44.67 ± 1.11
30 °C	BMLac	4.43 ± 0.13	21.70 ± 0.70	26.20 ± 1.39	38.13 ± 1.88	
	24 °C	BMG	7.71 ± 1.46	31.60 ± 7.86	37.17 ± 7.03	44.27 ± 5.29
30 °C	BMLac	3.65 ± 0.26	18.47 ± 1.1	26.23 ± 0.21	37.20 ± 0.26	

\*Se refiere al cultivo en el medio de generación de biomasa antes de transferir a BMM.

\*\*Se refiere al empleo de BMM + CaCl<sub>2</sub> como medio de inducción, en comparación con el medio sin CaCl<sub>2</sub>. Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

**Tabla 103.** Densidad celular de los cultivos (gDCW/L) al finalizar el cultivo de generación de biomasa y a 0, 24 y 48 h de inducción con metanol.

Cepa	Temperatura	Medio de generación de biomasa	Densidad celular a diferentes tiempos de inducción (gDCW/L)			
			Previo*	0 h	24 h	48 h
KM71FTEII-LAC	30 °C	BMG	2.03 ± 0.07	7.95 ± 0.10	9.42 ± 0.06	12.33 ± 0.53
		BMG (+ CaCl <sub>2</sub> )**	1.72 ± 0.10	6.65 ± 0.4	8.69 ± 0.38	10.60 ± 0.27
		BMLac	1.08 ± 0.03	5.47 ± 0.35	6.92 ± 0.24	9.90 ± 0.10
	24 °C	BMLac (+ CaCl <sub>2</sub> )	1.29 ± 0.06	6.23 ± 0.22	8.03 ± 0.21	10.33 ± 0.17
		BMG	0.79 ± 0.06	4.32 ± 0.35	6.43 ± 0.32	9.05 ± 0.47
		BMG (+ CaCl <sub>2</sub> )	0.59 ± 0.22	5.12 ± 2.64	7.22 ± 1.47	9.28 ± 1.13
KM71 HGH22K-LAC	30 °C	BMLac	0.88 ± 0.03	4.89 ± 0.28	6.38 ± 0.04	9.53 ± 0.11
		BMLac (+ CaCl <sub>2</sub> )	0.59 ± 0.22	3.22 ± 1.36	5.12 ± 1.51	8.36 ± 1.32
	24 °C	BMG	1.91 ± 0.16	7.43 ± 0.60	8.40 ± 1.10	10.27 ± 0.25
30 °C	BMLac	1.02 ± 0.03	4.99 ± 0.16	6.03 ± 0.32	8.77 ± 0.43	
	24 °C	BMG	1.77 ± 0.34	7.27 ± 1.81	8.55 ± 1.62	10.18 ± 1.22
30 °C	BMLac	0.84 ± 0.06	4.25 ± 0.25	6.03 ± 0.05	8.56 ± 0.06	

\*Se refiere al cultivo en el medio de generación de biomasa antes de transferir a BMM.

\*\*Se refiere al empleo de BMM + CaCl<sub>2</sub> como medio de inducción, en comparación con el medio sin CaCl<sub>2</sub>. Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.



**Tabla 104.** Concentración de proteínas extracelulares totales producidas por las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 0, 24 y 48 h de inducción, determinada por el método de Bradford.

Cepa	Temperatura	Medio de generación de biomasa	Concentración de proteínas extracelulares totales ( $\mu\text{g/mL}$ )		
			Método de Bradford		
			0 h	24 h	48 h
KM71FTEII-LAC	30 °C	BMG	12.81 $\pm$ 1.04 <sup>ab</sup>	248.58 $\pm$ 29.12 <sup>ab</sup>	362.07 $\pm$ 28.17 <sup>a</sup>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	13.47 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	273.82 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	401.57 $\pm$ 15.94 <sup>a</sup>
		BMLac	17.28 $\pm$ 1.00 <sup>c</sup>	193.80 $\pm$ 13.79 <sup>cd</sup>	374.19 $\pm$ 19.33 <sup>a</sup>
	24 °C	BMLac (+CaCl <sub>2</sub> )	21.65 $\pm$ 0.96 <sup>d</sup>	346.94 $\pm$ 20.5 <sup>e</sup>	510.51 $\pm$ 34.46 <sup>b</sup>
		BMG	12.49 $\pm$ 1.16 <sup>ab</sup>	154.74 $\pm$ 6.20 <sup>f</sup>	248.28 $\pm$ 21.55 <sup>c</sup>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	12.18 $\pm$ 0.39 <sup>abc</sup>	217.66 $\pm$ 4.69 <sup>bc</sup>	374.01 $\pm$ 11.54 <sup>a</sup>
KM71FTEII	30 °C	BMLac	16.77 $\pm$ 1.86 <sup>c</sup>	153.75 $\pm$ 7.91 <sup>f</sup>	234.86 $\pm$ 10.41 <sup>c</sup>
		BMLac (+CaCl <sub>2</sub> )	21.95 $\pm$ 0.50 <sup>d</sup>	176.00 $\pm$ 5.42 <sup>df</sup>	266.16 $\pm$ 3.91 <sup>c</sup>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	9.16 $\pm$ 0.85 <sup>e</sup>	515.10 $\pm$ 7.55 <sup>g</sup>	627.88 $\pm$ 2.68 <sup>d</sup>
	24 °C	BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	10.18 $\pm$ 0.48 <sup>bc</sup>	324.42 $\pm$ 3.73 <sup>e</sup>	522.74 $\pm$ 49.26 <sup>b</sup>

+CaCl<sub>2</sub>: empleo de BMM+CaCl<sub>2</sub> como medio de inducción.

Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Los datos de los tres tiempos de una misma condición son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) entre sí.

**Tabla 105.** Concentración de proteínas extracelulares totales producidas por las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 0, 24 y 48 h de inducción, determinadas por el método de BCA.

Cepa	Temperatura	Medio de generación de biomasa	Concentración de proteínas extracelulares totales ( $\mu\text{g/mL}$ )		
			Método de BCA		
			0 h	24 h	48 h
KM71 FTEII-LAC	30 °C	BMG	409.04 $\pm$ 19.00 <sup>a</sup>	3288.88 $\pm$ 40.46 <sup>a</sup>	7355.48 $\pm$ 240.70 <sup>a</sup>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	272.04 $\pm$ 3.41 <sup>a</sup>	865.67 $\pm$ 33.99 <sup>b</sup>	1349.03 $\pm$ 68.10 <sup>b</sup>
		BMLac	404.53 $\pm$ 35.96 <sup>a</sup>	2996.73 $\pm$ 591.99 <sup>ac</sup>	4970.61 $\pm$ 357.66 <sup>c</sup>
	24 °C	BMLac (+CaCl <sub>2</sub> )	9078.37 $\pm$ 291.85 <sup>b</sup>	676.54 $\pm$ 13.29 <sup>b</sup>	1199.36 $\pm$ 24.79 <sup>b</sup>
		BMG	337.18 $\pm$ 7.72 <sup>a</sup>	2332.38 $\pm$ 145.77 <sup>cd</sup>	4700.42 $\pm$ 589.45 <sup>c</sup>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	296.07 $\pm$ 22.74 <sup>a</sup>	693.47 $\pm$ 41.94 <sup>b</sup>	1092.97 $\pm$ 37.07 <sup>b</sup>
KM71 FTEII	30 °C	BMLac	488.88 $\pm$ 67.92 <sup>a</sup>	2187.32 $\pm$ 296.33 <sup>d</sup>	3565.53 $\pm$ 228.35 <sup>d</sup>
		BMLac (+CaCl <sub>2</sub> )	9198.18 $\pm$ 325.97 <sup>b</sup>	<u>932.44 <math>\pm</math> 64.8<sup>b</sup></u>	<u>1091.06 <math>\pm</math> 24.79<sup>b</sup></u>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	463.26 $\pm$ 36.79 <sup>a</sup>	4497.57 $\pm$ 253.64 <sup>e</sup>	8464.22 $\pm$ 133.40 <sup>e</sup>
	24 °C	BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	421.01 $\pm$ 69.07 <sup>a</sup>	7344.17 $\pm$ 130.57 <sup>f</sup>	8487.83 $\pm$ 107.54 <sup>e</sup>

+CaCl<sub>2</sub>: empleo de BMM+CaCl<sub>2</sub> como medio de inducción.

Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Los datos de los tres tiempos de una misma condición son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) entre sí, excepto los subrayados, que no presentan diferencia significativa entre los mismos.

**Tabla 106.** Rendimiento de proteínas extracelulares producidas por unidad de biomasa de las cepas KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 24 y 48 h de inducción, determinadas por el método de BCA.

Cepa	Tempe- ratura	Medio de generación de biomasa	Método de BCA	
			Rendimiento de proteínas extracelulares totales por unidad de biomasa (mg/gDCW)	
			24 h	48 h
KM71FTEII-LAC	30 °C	BMG	349.06 ± 5.03 <sup>a</sup>	597.04 ± 20.91 <sup>a</sup>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	99.76 ± 5.19 <sup>b</sup>	127.35 ± 8.74 <sup>b</sup>
		BMLac	<u>434.83 ± 93.98<sup>a</sup></u>	<u>502.41 ± 39.74<sup>a</sup></u>
	24 °C	BMLac (+CaCl <sub>2</sub> )	<u>84.27 ± 3.80<sup>b</sup></u>	<u>116.06 ± 2.20<sup>b</sup></u>
		BMG	<u>363.92 ± 40.74<sup>a</sup></u>	<u>522.41 ± 94.37<sup>a</sup></u>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	<u>98.77 ± 21.09<sup>b</sup></u>	<u>119.17 ± 16.77<sup>b</sup></u>
		BMLac	<u>343.09 ± 48.27<sup>a</sup></u>	<u>374.22 ± 25.01<sup>c</sup></u>
		BMLac (+CaCl <sub>2</sub> )	<u>197.78 ± 80.23<sup>b</sup></u>	<u>133.21 ± 25.23<sup>b</sup></u>
		BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	581.22 ± 11.38 <sup>c</sup>	940.43 ± 15.79 <sup>d</sup>
KM71FTEII	30 °C	BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	581.22 ± 11.38 <sup>c</sup>	940.43 ± 15.79 <sup>d</sup>
	24 °C	BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	801.00 ± 12.86 <sup>d</sup>	760.91 ± 9.69 <sup>c</sup>

+CaCl<sub>2</sub>: empleo de BMM+CaCl<sub>2</sub> como medio de inducción.

Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Los datos de los dos tiempos de una misma condición son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) entre sí, excepto los subrayados, que no presentan diferencia significativa entre los mismos.

**Tabla 107.** Actividad de FTEII en sobrenadante de los cultivos de KM71FTEII-LAC y KM71FTEII a las 0, 24 y 48 h de inducción.

Cepa	Tempe- ratura	Medio de generación de biomasa	Actividad de FTEII en sobrenadante (U/mL)		
			0 h	24 h	48 h
			KM71FTEII- LAC	30 °C	BMG
BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	0.00 ± 0.01	1.33 ± 0.18 <sup>a</sup>			1.88 ± 0.20 <sup>a</sup>
BMLac	-0.03 ± 0.03	2.13 ± 0.20 <sup>b</sup>			3.20 ± 0.37 <sup>b</sup>
24 °C	BMLac (+CaCl <sub>2</sub> )	0.00 ± 0.00		<u>1.97 ± 0.09<sup>b</sup></u>	<u>1.83 ± 0.25<sup>a</sup></u>
	BMG	-0.03 ± 0.03		0.70 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.56 ± 0.08 <sup>a</sup>
	BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	0.01 ± 0.02		0.66 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.90 ± 0.13 <sup>a</sup>
	BMLac	-0.05 ± 0.00		0.85 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.63 ± 0.12 <sup>a</sup>
	BMLac (+CaCl <sub>2</sub> )	0.00 ± 0.00		1.38 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.88 ± 0.15 <sup>a</sup>
	BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	-0.04 ± 0.00		3.98 ± 0.06 <sup>d</sup>	5.13 ± 0.35 <sup>c</sup>
KM71FTEII	30 °C	BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	-0.04 ± 0.00	3.98 ± 0.06 <sup>d</sup>	5.13 ± 0.35 <sup>c</sup>
	24 °C	BMG (+CaCl <sub>2</sub> )	-0.05 ± 0.01	2.70 ± 0.20 <sup>c</sup>	5.27 ± 0.32 <sup>c</sup>

+CaCl<sub>2</sub>: empleo de BMM+CaCl<sub>2</sub> como medio de inducción.

Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

Los datos en *itálicas* (0 h) pueden no ser confiables por la baja actividad de FTEII en la muestra.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Los datos de los tres distintos tiempos de una misma condición son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ), excepto los subrayados, que no presentan diferencia significativa entre los mismos.

**Tabla 108.** Concentración de proteínas extracelulares totales en sobrenadante producidas por las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción, determinadas por los métodos de Bradford y BCA

Cepa	Temperatura	Medio de generación de biomasa	Proteínas extracelulares totales (µg/mL)		
			Método de Bradford		
			0 h	24 h	48 h
KM71HGH22K-LAC	30 °C	BMG	7.05 ± 0.65 <sup>a</sup>	19.17 ± 0.92 <sup>a</sup>	28.08 ± 1.69 <sup>a</sup>
		BMLac	8.72 ± 0.84 <sup>a</sup>	28.59 ± 2.06 <sup>b</sup>	42.68 ± 1.90 <sup>b</sup>
	24 °C	BMG	7.78 ± 2.08 <sup>a</sup>	28.03 ± 0.68 <sup>b</sup>	37.85 ± 1.37 <sup>c</sup>
		BMLac	8.73 ± 1.52 <sup>a</sup>	19.60 ± 0.92 <sup>a</sup>	26.62 ± 1.31 <sup>ad</sup>
KM71HGH22K	30 °C	BMG	8.73 ± 0.67 <sup>a</sup>	16.89 ± 1.31 <sup>a</sup>	32.63 ± 0.43 <sup>c</sup>
	24 °C	BMG	9.85 ± 0.51 <sup>a</sup>	12.09 ± 0.94 <sup>c</sup>	24.01 ± 0.42 <sup>d</sup>

Cepa	Temperatura	Medio de generación de biomasa	Proteínas extracelulares totales (µg/mL)		
			Método de BCA		
			0 h	24 h	48 h
KM71HGH22K-LAC	30 °C	BMG	ND	95.20 ± 4.43 <sup>a</sup>	209.65 ± 12.28 <sup>ab</sup>
		BMLac	ND	131.96 ± 3.07 <sup>b</sup>	299.18 ± 35.64 <sup>c</sup>
	24 °C	BMG	ND	117.67 ± 3.87 <sup>c</sup>	255.29 ± 8.92 <sup>bc</sup>
		BMLac	ND	101.91 ± 10.13 <sup>a</sup>	242.86 ± 25.93 <sup>b</sup>
KM71HGH22K	30 °C	BMG	7.70 ± 0.68 <sup>a</sup>	40.08 ± 2.94 <sup>d</sup>	164.61 ± 7.61 <sup>ad</sup>
	24 °C	BMG	9.00 ± 1.60 <sup>a</sup>	30.37 ± 1.06 <sup>d</sup>	152.88 ± 2.41 <sup>d</sup>

ND: no determinado.

Los datos indican los promedios de cultivos por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Los datos de los tres tiempos de una misma condición son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) entre sí.

**Tabla 109.** Concentración de hGH en sobrenadante producida por las cepas KM71HGH22K-LAC y KM71HGH22K a las 0, 24 y 48 h de inducción, determinada por ELISA.

Cepa	Temperatura	Medio de generación de biomasa	Concentración de hGH en sobrenadante (ng/mL)		
			0 h	24 h	48 h
KM71HGH22K-LAC	30 °C	BMG	19.85 ± 1.53 <sup>a</sup>	793.61 ± 92.48 <sup>a</sup>	1724.12 ± 125.07 <sup>a</sup>
		BMLac	40.36 ± 6.18 <sup>b</sup>	3969.72 ± 722.78 <sup>b</sup>	11863.59 ± 1827.77 <sup>b</sup>
	24 °C	BMG	20.86 ± 1.83 <sup>ac</sup>	1006.84 ± 192.69 <sup>a</sup>	9466.54 ± 1899.62 <sup>bc</sup>
		BMLac	29.96 ± 3.4 <sup>c</sup>	3388.90 ± 627.55 <sup>b</sup>	7298.02 ± 46.08 <sup>bcd</sup>
KM71HGH22K	30 °C	BMG	ND	954.93 ± 146.98 <sup>a</sup>	3435.96 ± 483.28 <sup>ad</sup>
	24 °C	BMG	ND	1127.93 ± 324.92 <sup>a</sup>	5724.87 ± 1727.72 <sup>acd</sup>

ND: no determinado.

Los datos de 24 y 48 h de la cepa KM71HGH22K-LAC se obtuvieron eliminando un dato de los triplicados para reducir la variación. El resto de los datos se obtuvo por triplicado.

Los datos muestran el promedio de triplicados o duplicados, y su respectiva desviación estándar.

La diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre condiciones (datos de una misma columna) se indica si no existe al menos una letra igual entre los datos comparados. Los datos de los tres tiempos de una misma condición son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) entre sí.

## ANEXO 4. INFORMACIÓN DE MUESTRAS EMPLEADAS EN RT-qPCR

**Tabla 110.** Concentración, relación  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  de las muestras de RNA utilizadas en los ensayos de RT-qPCR.

Condición de cultivo	M	RIN	RNA sin procesar			RNA tratado con DNasa		
			Concentración (ng/μL)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	Concentración (ng/μL)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
F-L 30 °C BMG 0 h	2	7.4	728	2.167	2.459	303	2.063	1.855
F-L 30 °C BMG 24 h	2	7.7	566	2.182	2.4	432	2.063	2.099
F-L 30 °C BMG 48 h	1	ND	18	2.143	2.045	18	1.86	0.682
F-L 30 °C BMG 48 h	2	ND	132	2.178	2.082	48.4	2.017	1.192
F-L 30 °C BMG (+Ca) 48 h	1	ND	182	2.131	2.054	97.2	2.059	1.328
F-L 30 °C BMLac 0 h	2	8.3	1200	2.166	2.439	848	2.058	2.22
F-L 30 °C BMLac 24 h	2	8.8	494	2.18	2.373	378	2.039	1.915
F-L 30 °C BMLac 48 h	1	ND	17.6	2.095	2.316	24	1.875	0.811
F-L 30 °C BMLac 48 h	2	ND	106	2.172	1.626	87.6	2.106	1.386
F-L 24 °C BMG 0 h	2	9.3	201	2.211	2.155	84.8	2.019	1.165
F-L 24 °C BMG 24 h	2	8.7	250	2.216	2.256	170	2.048	1.549
F-L 24 °C BMG (+Ca) 48 h	1	ND	191	2.173	1.466	137	2.091	1.212
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	9.1	211	2.209	2.247	158	2.052	1.706
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	7.1	394	2.182	2.252	267	2.078	1.803
F-L 24 °C BMLac 48 h	1	ND	28.4	2.152	0.826	28	1.892	0.68
F-L 24 °C BMLac 48 h	2	9.9	190	2.174	2.034	107	2.07	1.413
F-L 24 °C BMG (+Ca) 48 h	1	ND	136	2.166	1.298	82.4	2.081	0.9
F-C 30 °C BMG 0 h	2A	8	26	2.5	1.226	15.6	1.95	0.336
F-C 30 °C BMG 0 h	2B	4.6	325	2.134	2.069	213	2.066	1.625
F-C 30 °C BMG 24 h	2R	8.9	92.8	2.21	1.771	75.2	2.066	1.033
F-C 24 °C BMG 0 h	2A	7.1	154	2.169	2.064	90	2.027	1.25
F-C 24 °C BMG 0 h	2B	7.6	748	2.125	2.461	477	2.088	2.069
F-C 24 °C BMG 24 h	2	5.5	182	2.141	2.192	109	2.076	1.402
H-L 30 °C BMG 0 h	2	NA	1566	2.134	2.088	1162	1.99	1.886
H-L 30 °C BMG 0 h	3	10	700	2.16	2.431	435	2.076	1.993
H-L 30 °C BMG 24 h	2	6.4	662	2.108	2.221	403	2.026	1.834
H-L 30 °C BMG 24 h	3	10	816	2.114	2.125	396	2.025	1.631
H-L 30 °C BMG 48 h	2	8.4	156	2.273	2.341	102	2.016	1.192
H-L 30 °C BMG 48 h	3	3.2	450	2.143	2.25	302	2.043	1.749
H-L 30 °C BMLac 0 h	2	8.3	942	2.151	2.309	576	2.04	1.902
H-L 30 °C BMLac 0 h	3	10	410	2.174	2.51	248	2.07	1.831
H-L 30 °C BMLac 24 h	3	10	64.8	2.282	2.945	24.8	1.824	0.626
H-L 30 °C BMLac 48 h	1	ND	151	2.205	2.257	84.8	2.099	1.423
H-L 30 °C BMLac 48 h	2	8.9	63.2	2.29	1.975	40.8	1.889	0.694
H-L 30 °C BMLac 48 h	3	8.4	650	2.138	2.372	338	2.076	1.907
H-L 24 °C BMG 0 h	3	8.3	204	2.156	1.996	72.4	2.034	1.24
H-L 24 °C BMG 24 h	3	9.2	277	2.204	2.338	148	2.027	1.611
H-L 24 °C BMG 48 h	1	ND	60.4	2.188	3.082	49.2	2.121	1.268
H-L 24 °C BMG 48 h	3	2.4	114	2.209	2.021	41.2	1.943	0.866
H-L 24 °C BMLac 0 h	3	9.8	828	2.179	2.479	517	2.085	2.089
H-L 24 °C BMLac 24 h	3	9	298	2.208	2.369	118	2.056	1.6
H-L 24 °C BMLac 48 h	1	ND	47.6	2.164	3.051	42.4	2.038	2.038
H-L 24 °C BMLac 48 h	3	8.9	125	2.213	2.245	40	2	0.917
H-C 30 °C BMG 0 h	1	2.6	263	2.175	2.389	125	2.059	1.639
H-C 30 °C BMG 48 h	1	8.2	91.6	2.223	2.313	65.2	2.09	1.058
H-C 24 °C BMG 0 h	2	7.7	506	2.121	2.273	406	2.074	1.992
H-C 24 °C BMG 24 h	2	6	276	2.163	2.156	188	2.075	1.675

M: matraz, (+Ca): cultivadas en medio de inducción BMM+CaCl<sub>2</sub>, NA: no se pudo calcular el RIN, ND: no se analizó la muestra con el bioanalizador.

**Tabla 111.** Información sobre el procesamiento y análisis de las muestras de RNA utilizadas en los ensayos de RT-qPCR.

Condición de cultivo	M	RIN	Identificador		Fecha del procedimiento*			Método**	
			Chip	#	RNA	DNasa	RT		
F-L 30 °C BMG 0 h	2	7.4	Chip 1	28/09/2016	5	23/09	23/09	23/09	P
F-L 30 °C BMG 24 h	2	7.7	Chip 1	28/09/2016	7	23/09	23/09	23/09	P
F-L 30 °C BMG 48 h	1	ND		ND	ND	27/04	28/04	28/04	P
F-L 30 °C BMG 48 h	2	ND		ND	ND	06/10	06/10	07/10	P
F-L 30 °C BMG (+Ca) 48 h	1	ND		ND	ND	06/10	06/10	07/10	P
F-L 30 °C BMLac 0 h	2	8.3	Chip 1	28/09/2016	6	23/09	23/09	23/09	P
F-L 30 °C BMLac 24 h	2	8.8	Chip 1	28/09/2016	8	23/09	23/09	23/09	P
F-L 30 °C BMLac 48 h	1	ND		ND	ND	27/04	28/04	28/04	P
F-L 30 °C BMLac 48 h	2	ND		ND	ND	06/10	06/10	07/10	P
F-L 24 °C BMG 0 h	2	9.3	Chip 1	28/09/2016	1	23/09	23/09	23/09	P
F-L 24 °C BMG 24 h	2	8.7	Chip 1	28/09/2016	3	23/09	23/09	23/09	P
F-L 24 °C BMG (+Ca) 48 h	1	ND		ND	ND	06/10	06/10	07/10	P
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	9.1	Chip 1	28/09/2016	2	23/09	23/09	23/09	P
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	7.1	Chip 1	28/09/2016	4	23/09	23/09	23/09	P
F-L 24 °C BMLac 48 h	1	ND		ND	ND	27/04	28/04	28/04	P
F-L 24 °C BMLac 48 h	2	9.9	Chip 2	29/09/2016	12	06/10	06/10	07/10	P
F-L 24 °C BMG (+Ca) 48 h	1	ND		ND	ND	06/10	06/10	07/10	P
F-C 30 °C BMG 0 h	2A	8	Chip 1	29/09/2016	11	28/09	03/10	04/10	P
F-C 30 °C BMG 0 h	2B	4.6	Chip 1	29/09/2016	12	28/09	03/10	04/10	P
F-C 30 °C BMG 24 h	2R	8.9	Chip 2	29/09/2016	2	28/09	03/10	04/10	P
F-C 24 °C BMG 0 h	2A	7.1	Chip 2	29/09/2016	6	28/09	03/10	04/10	P
F-C 24 °C BMG 0 h	2B	7.6	Chip 2	29/09/2016	5	28/09	03/10	04/10	P
F-C 24 °C BMG 24 h	2	5.5	Chip 2	29/09/2016	7	28/09	03/10	04/10	P
H-L 30 °C BMG 0 h	2	NA	Chip 3	29/09/2016	1	28/09	03/10	04/10	MN
H-L 30 °C BMG 0 h	3	10	Chip 2	28/09/2016	7	26/09	26/09	27/09	P
H-L 30 °C BMG 24 h	2	6.4	Chip 3	29/09/2016	2	28/09	03/10	04/10	MN
H-L 30 °C BMG 24 h	3	10	Chip 2	29/09/2016	10	28/09	03/10	04/10	MN
H-L 30 °C BMG 48 h	2	8.4	Chip 1	28/09/2016	9	21/09	21/09	21/09	P
H-L 30 °C BMG 48 h	3	3.2	Chip 3	29/09/2016	5	28/09	03/10	04/10	MN
H-L 30 °C BMLac 0 h	2	8.3	Chip 1	29/09/2016	3	28/09	03/10	04/10	MN
H-L 30 °C BMLac 0 h	3	10	Chip 2	28/09/2016	8	26/09	26/09	27/09	P
H-L 30 °C BMLac 24 h	3	10	Chip 2	28/09/2016	9	26/09	26/09	27/09	P
H-L 30 °C BMLac 48 h	1	ND		ND	ND	06/10	06/10	07/10	P
H-L 30 °C BMLac 48 h	2	8.9	Chip 1	28/09/2016	10	21/09	21/09	21/09	P
H-L 30 °C BMLac 48 h	3	8.4	Chip 1	29/09/2016	8	28/09	03/10	04/10	MN
H-L 24 °C BMG 0 h	3	8.3	Chip 2	28/09/2016	1	26/09	26/09	27/09	P
H-L 24 °C BMG 24 h	3	9.2	Chip 2	28/09/2016	3	26/09	26/09	27/09	P
H-L 24 °C BMG 48 h	1	ND		ND	ND	27/04	28/04	28/04	P
H-L 24 °C BMG 48 h	3	2.4	Chip 2	28/09/2016	5	26/09	26/09	27/09	P
H-L 24 °C BMLac 0 h	3	9.8	Chip 2	28/09/2016	2	26/09	26/09	27/09	P
H-L 24 °C BMLac 24 h	3	9	Chip 2	28/09/2016	4	26/09	26/09	27/09	P
H-L 24 °C BMLac 48 h	1	ND		ND	ND	27/04	28/04	28/04	P
H-L 24 °C BMLac 48 h	3	8.9	Chip 2	28/09/2016	6	26/09	26/09	27/09	P
H-C 30 °C BMG 0 h	1	2.6	Chip 2	29/09/2016	8	28/09	03/10	04/10	P
H-C 30 °C BMG 48 h	1	8.2	Chip 3	29/09/2016	7	28/09	03/10	04/10	P
H-C 24 °C BMG 0 h	2	7.7	Chip 2	28/09/2016	11	28/09	03/10	04/10	P
H-C 24 °C BMG 24 h	2	6	Chip 2	28/09/2016	12	28/09	03/10	04/10	P

\*Las fechas se presentan en formato día/mes del 2016 y se refieren a la fecha de extracción de RNA (RNA), del tratamiento de la muestra con DNasa (DNasa) y de la RT (RT).

\*\*Método de extracción de RNA. P: kit de Promega, MN: kit de Macherey Nagel

M: matraz, (+Ca): cultivadas en medio de inducción BMM+CaCl<sub>2</sub>, NA: no se pudo calcular el RIN, ND: no se analizó la muestra con el bioanalizador.

## ANEXO 5. DATOS DE RT-qPCR

**Tabla 112.** Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis del gen *G6PD* de las muestras de cultivos de inducción.

<b>Gen <i>G6PD</i></b>						
<b>Condición de cultivo</b>	<b>Matraz</b>	<b><math>C_T</math> 1</b>	<b><math>C_T</math> 2</b>	<b>Media</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Dilución</b>
F-L 30 °C BMG 0 h	2	26.89	27.24	27.07	0.91	25
F-L 30 °C BMG 24 h	2	27.07	27.30	27.19	0.60	25
F-L 30 °C BMG 48 h	1	27.23	27.26	27.25	0.08	25
F-L 30 °C BMG 48 h	2	25.87	25.80	25.84	0.19	25
F-L 30 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	27.49	27.46	27.48	0.08	25
F-L 30 °C BMLac 0 h	2	26.22	26.25	26.24	0.08	25
F-L 30 °C BMLac 24 h	2	26.61	26.72	26.67	0.29	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	1	28.14	28.02	28.08	0.30	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	2	28.22	28.30	28.26	0.20	25
F-L 24 °C BMG 0 h	2	26.33	26.41	26.37	0.21	25
F-L 24 °C BMG 24 h	2	25.15	25.68	25.42	1.47	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	26.88	26.86	26.87	0.05	25
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	26.92	27.28	27.10	0.94	25
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	26.46	26.53	26.50	0.19	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	1	26.26	26.41	26.34	0.40	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	2	27.25	27.08	27.17	0.44	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	26.02	26.07	26.05	0.14	25
F-C 30 °C BMG 0 h	2A	32.72	32.97	32.85	0.54	25
F-C 30 °C BMG 0 h	2B	28.75	28.52	28.64	0.57	25
F-C 30 °C BMG 24 h	2R	25.32	25.75	25.54	1.19	25
F-C 24 °C BMG 0 h	2A	26.90	26.85	26.88	0.13	25
F-C 24 °C BMG 0 h	2B	27.18	27.03	27.11	0.39	25
F-C 24 °C BMG 24 h	2	27.80	27.55	27.68	0.64	25
H-L 30 °C BMG 0 h	2	26.40	26.45	26.43	0.13	25
H-L 30 °C BMG 0 h	3	27.39	27.67	27.53	0.72	25
H-L 30 °C BMG 24 h	2	24.90	24.96	24.93	0.17	25
H-L 30 °C BMG 24 h	3	25.43	25.22	25.33	0.59	25
H-L 30 °C BMG 48 h	2	24.87	25.03	24.95	0.45	25
H-L 30 °C BMG 48 h	3	25.09	25.18	25.14	0.25	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	2	25.56	25.83	25.70	0.74	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	3	25.81	26.18	26.00	1.01	25
H-L 30 °C BMLac 24 h	3	30.81	30.87	30.84	0.14	5
H-L 30 °C BMLac 48 h	1	27.60	27.67	27.64	0.18	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	2	27.74	27.49	27.62	0.64	125
H-L 30 °C BMLac 48 h	3	25.49	25.94	25.72	1.24	25
H-L 24 °C BMG 0 h	3	27.41	27.37	27.39	0.10	25
H-L 24 °C BMG 24 h	3	27.11	27.25	27.18	0.36	25
H-L 24 °C BMG 48 h	1	27.22	27.01	27.12	0.55	25
H-L 24 °C BMG 48 h	3	26.48	26.59	26.54	0.29	25
H-L 24 °C BMLac 0 h	3	26.82	26.66	26.74	0.42	25
H-L 24 °C BMLac 24 h	3	26.02	26.01	26.02	0.03	25
H-L 24 °C BMLac 48 h	1	28.57	27.55	28.06	2.57	25
H-L 24 °C BMLac 48 h	3	26.11	26.00	26.06	0.30	25
H-C 30 °C BMG 0 h	1	26.33	26.38	26.36	0.13	25
H-C 30 °C BMG 48 h	1	26.87	27.19	27.03	0.84	25
H-C 24 °C BMG 0 h	2	26.99	27.44	27.22	1.17	25
H-C 24 °C BMG 24 h	2	28.06	27.98	28.02	0.20	25

**Tabla 113.** Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis del gen *YPTI* de las muestras de cultivos de inducción.

<b>Gen <i>YPTI</i></b>						
<b>Condición de cultivo</b>	<b>Matraz</b>	<b><math>C_T</math> 1</b>	<b><math>C_T</math> 2</b>	<b>Media</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Dilución</b>
F-L 30 °C BMG 0 h	2	27.59	27.58	27.59	0.03	25
F-L 30 °C BMG 24 h	2	27.86	27.76	27.81	0.25	25
F-L 30 °C BMG 48 h	1	27.92	27.96	27.94	0.10	25
F-L 30 °C BMG 48 h	2	26.82	27.06	26.94	0.63	25
F-L 30 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	27.64	27.90	27.77	0.66	25
F-L 30 °C BMLac 0 h	2	26.97	26.94	26.96	0.08	25
F-L 30 °C BMLac 24 h	2	27.26	27.52	27.39	0.67	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	1	29.08	29.43	29.26	0.85	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	2	28.14	28.32	28.23	0.45	25
F-L 24 °C BMG 0 h	2	27.25	27.17	27.21	0.21	25
F-L 24 °C BMG 24 h	2	26.54	26.62	26.58	0.21	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	27.83	27.99	27.91	0.41	25
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	28.08	28.08	28.08	0.00	25
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	27.73	27.54	27.64	0.49	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	1	28.89	29.04	28.97	0.37	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	2	28.41	28.61	28.51	0.50	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	27.73	27.93	27.83	0.51	25
F-C 30 °C BMG 0 h	2A	28.90	28.90	28.90	0.00	5
F-C 30 °C BMG 0 h	2B	30.51	30.16	30.34	0.82	25
F-C 30 °C BMG 24 h	2R	26.59	26.79	26.69	0.53	25
F-C 24 °C BMG 0 h	2A	27.94	27.88	27.91	0.15	25
F-C 24 °C BMG 0 h	2B	27.75	27.94	27.85	0.48	25
F-C 24 °C BMG 24 h	2	28.66	29.14	28.90	1.17	25
H-L 30 °C BMG 0 h	2	27.67	27.51	27.59	0.41	25
H-L 30 °C BMG 0 h	3	27.41	27.64	27.53	0.59	25
H-L 30 °C BMG 24 h	2	25.73	25.94	25.84	0.57	25
H-L 30 °C BMG 24 h	3	25.56	25.88	25.72	0.88	25
H-L 30 °C BMG 48 h	2	25.92	25.95	25.94	0.08	25
H-L 30 °C BMG 48 h	3	25.50	25.75	25.63	0.69	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	2	25.99	26.04	26.02	0.14	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	3	26.64	26.67	26.66	0.08	25
H-L 30 °C BMLac 24 h	3	29.59	29.79	29.69	0.48	5
H-L 30 °C BMLac 48 h	1	26.92	27.10	27.01	0.47	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	2	25.81	25.73	25.77	0.22	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	3	26.03	25.98	26.01	0.14	25
H-L 24 °C BMG 0 h	3	27.80	28.15	27.98	0.88	25
H-L 24 °C BMG 24 h	3	27.28	27.42	27.35	0.36	25
H-L 24 °C BMG 48 h	1	28.65	28.52	28.59	0.32	25
H-L 24 °C BMG 48 h	3	27.92	27.78	27.85	0.36	25
H-L 24 °C BMLac 0 h	3	27.46	27.44	27.45	0.05	25
H-L 24 °C BMLac 24 h	3	26.52	27.11	26.82	1.56	25
H-L 24 °C BMLac 48 h	1	28.25	28.31	28.28	0.15	25
H-L 24 °C BMLac 48 h	3	26.65	26.77	26.71	0.32	25
H-C 30 °C BMG 0 h	1	28.02	28.42	28.22	1.00	25
H-C 30 °C BMG 48 h	1	28.17	28.43	28.30	0.65	25
H-C 24 °C BMG 0 h	2	28.08	28.05	28.07	0.08	25
H-C 24 °C BMG 24 h	2	28.94	29.08	29.01	0.34	25

Los valores de  $C_T$  en *itálicas* se encuentran fuera del intervalo de linealidad del gen.

**Tabla 114.** Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis del gen *GAP* de las muestras de cultivos de inducción.

Condición de cultivo	Matraz	Gen <i>GAP</i>		Media	CV (%)	Dilución
		$C_T$ 1	$C_T$ 2			
F-L 30 °C BMG 0 h	2	25.15	25.21	25.18	0.17	25
F-L 30 °C BMG 24 h	2	29.32	28.98	29.15	0.82	25
F-L 30 °C BMG 48 h	1	28.67	27.86	28.27	2.03	25
F-L 30 °C BMG 48 h	2	27.86	27.61	27.74	0.64	25
F-L 30 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	29.57	29.29	29.43	0.67	25
F-L 30 °C BMLac 0 h	2	27.72	27.63	27.68	0.23	125
F-L 30 °C BMLac 24 h	2	28.17	28.21	28.19	0.10	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	1	29.51	28.77	29.14	1.80	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	2	29.53	29.47	29.50	0.14	25
F-L 24 °C BMG 0 h	2	25.79	25.37	25.58	1.16	25
F-L 24 °C BMG 24 h	2	26.72	26.94	26.83	0.58	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	28.21	27.76	27.99	1.14	25
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	27.48	26.74	27.11	1.93	125
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	27.29	27.22	27.26	0.18	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	1	27.65	27.66	27.66	0.03	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	2	28.76	28.91	28.84	0.37	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	25.81	26.20	26.01	1.06	25
F-C 30 °C BMG 0 h	2A	26.65	26.90	26.78	0.66	25
F-C 30 °C BMG 0 h	2B	25.94	25.75	25.85	0.52	25
F-C 30 °C BMG 24 h	2R	26.12	26.64	26.38	1.39	25
F-C 24 °C BMG 0 h	2A	25.12	24.89	25.01	0.65	25
F-C 24 °C BMG 0 h	2B	25.43	25.69	25.56	0.72	25
F-C 24 °C BMG 24 h	2	27.65	27.81	27.73	0.41	25
H-L 30 °C BMG 0 h	2	26.68	26.89	26.79	0.55	25
H-L 30 °C BMG 0 h	3	25.08	25.16	25.12	0.23	25
H-L 30 °C BMG 24 h	2	28.22	27.79	28.01	1.09	25
H-L 30 °C BMG 24 h	3	26.62	26.84	26.73	0.58	25
H-L 30 °C BMG 48 h	2	25.86	25.56	25.71	0.83	25
H-L 30 °C BMG 48 h	3	28.66	28.19	28.43	1.17	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	2	25.76	25.49	25.63	0.75	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	3	26.87	27.02	26.95	0.39	125
H-L 30 °C BMLac 24 h	3	32.06	31.71	31.89	0.78	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	1	27.35	27.80	27.58	1.15	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	2	25.86	25.61	25.74	0.69	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	3	27.44	27.58	27.51	0.36	25
H-L 24 °C BMG 0 h	3	26.13	25.91	26.02	0.60	25
H-L 24 °C BMG 24 h	3	27.58	27.70	27.64	0.31	25
H-L 24 °C BMG 48 h	1	28.40	28.84	28.62	1.09	25
H-L 24 °C BMG 48 h	3	29.69	29.06	29.38	1.52	25
H-L 24 °C BMLac 0 h	3	25.91	25.58	25.75	0.91	25
H-L 24 °C BMLac 24 h	3	26.43	26.63	26.53	0.53	25
H-L 24 °C BMLac 48 h	1	27.58	27.56	27.57	0.05	25
H-L 24 °C BMLac 48 h	3	27.63	27.50	27.57	0.33	25
H-C 30 °C BMG 0 h	1	26.49	26.57	26.53	0.21	125
H-C 30 °C BMG 48 h	1	27.81	27.95	27.88	0.36	25
H-C 24 °C BMG 0 h	2	25.65	25.69	25.67	0.11	25
H-C 24 °C BMG 24 h	2	28.54	27.90	28.22	1.60	25

Los valores de  $C_T$  en *itálicas* se encuentran fuera del intervalo de linealidad del gen.



**Tabla 115.** Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis del gen *LAC4* de las muestras de cultivos de inducción.

Condición de cultivo	Matraz	Gen <i>LAC4</i>		Media	CV (%)	Dilución
		$C_T$ 1	$C_T$ 2			
F-L 30 °C BMG 0 h	2	21.51	21.32	21.42	0.63	25
F-L 30 °C BMG 24 h	2	23.87	23.86	23.87	0.03	25
F-L 30 °C BMG 48 h	1	23.62	24.35	23.99	2.15	25
F-L 30 °C BMG 48 h	2	23.68	23.78	23.73	0.30	25
F-L 30 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	25.07	25.27	25.17	0.56	25
F-L 30 °C BMLac 0 h	2	22.94	22.92	22.93	0.06	125
F-L 30 °C BMLac 24 h	2	22.97	23.14	23.06	0.52	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	1	24.65	24.74	24.70	0.26	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	2	26.58	26.53	26.56	0.13	25
F-L 24 °C BMG 0 h	2	23.34	23.17	23.26	0.52	125
F-L 24 °C BMG 24 h	2	21.61	21.57	21.59	0.13	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	24.13	24.18	24.16	0.15	25
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	22.25	22.24	22.25	0.03	125
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	23.29	23.50	23.40	0.63	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	1	23.38	23.53	23.46	0.45	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	2	25.88	25.83	25.86	0.14	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	22.93	23.21	23.07	0.86	25
H-L 30 °C BMG 0 h	2	21.10	21.35	21.23	0.83	25
H-L 30 °C BMG 0 h	3	22.78	22.76	22.77	0.06	25
H-L 30 °C BMG 24 h	2	23.37	23.55	23.46	0.54	25
H-L 30 °C BMG 24 h	3	22.93	23.13	23.03	0.61	25
H-L 30 °C BMG 48 h	2	23.78	24.19	23.99	1.21	25
H-L 30 °C BMG 48 h	3	24.73	24.52	24.63	0.60	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	2	22.96	23.17	23.07	0.64	125
H-L 30 °C BMLac 0 h	3	21.73	21.78	21.76	0.16	25
H-L 30 °C BMLac 24 h	3	29.83	29.58	29.71	0.60	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	1	26.78	26.75	26.77	0.08	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	2	23.18	23.40	23.29	0.67	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	3	24.02	24.24	24.13	0.64	25
H-L 24 °C BMG 0 h	3	23.99	23.85	23.92	0.41	25
H-L 24 °C BMG 24 h	3	26.17	26.27	26.22	0.27	25
H-L 24 °C BMG 48 h	1	26.46	26.37	26.42	0.24	25
H-L 24 °C BMG 48 h	3	27.45	27.51	27.48	0.15	25
H-L 24 °C BMLac 0 h	3	22.68	22.82	22.75	0.44	25
H-L 24 °C BMLac 24 h	3	24.81	25.06	24.94	0.71	25
H-L 24 °C BMLac 48 h	1	25.54	25.26	25.40	0.78	25
H-L 24 °C BMLac 48 h	3	25.54	25.59	25.57	0.14	25

**Tabla 116.** Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ) del análisis del gen *aox1::ARG4* de las muestras de cultivos de inducción.

<b>Gen <i>aox1::ARG4</i></b>			
<b>Condición de cultivo</b>	<b>Matraz</b>	<b><math>C_T</math> 1</b>	<b>Dilución</b>
F-L 30 °C BMG 0 h	2	27.73	5
F-L 30 °C BMG 24 h	2	29.78	125
F-L 30 °C BMG 48 h	1	27.96	25
F-L 30 °C BMG 48 h	2	27.28	25
F-L 30 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	28.78	25
F-L 30 °C BMLac 0 h	2	29.42	5
F-L 30 °C BMLac 24 h	2	28.45	125
F-L 30 °C BMLac 48 h	1	29.13	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	2	29.65	25
F-L 24 °C BMG 0 h	2	26.09	5
F-L 24 °C BMG 24 h	2	28.48	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	29.04	25
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	27.51	5
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	25.76	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	1	29.46	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	2	29.96	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	29.99	25
F-C 30 °C BMG 0 h	2A	29.07	5
F-C 30 °C BMG 0 h	2B	28.78	5
F-C 30 °C BMG 24 h	2R	28.38	25
F-C 24 °C BMG 0 h	2A	26.64	5
F-C 24 °C BMG 0 h	2B	27.43	5
F-C 24 °C BMG 24 h	2	29.53	25
H-L 30 °C BMG 0 h	2	28.42	5
H-L 30 °C BMG 0 h	3	28.93	5
H-L 30 °C BMG 24 h	2	28.14	125
H-L 30 °C BMG 24 h	3	27.81	125
H-L 30 °C BMG 48 h	2	27.20	25
H-L 30 °C BMG 48 h	3	27.02	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	2	31.00	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	3	30.35	5
H-L 30 °C BMLac 24 h	3	33.34	125
H-L 30 °C BMLac 48 h	1	29.23	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	2	26.24	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	3	26.99	25
H-L 24 °C BMG 0 h	3	28.20	5
H-L 24 °C BMG 24 h	3	25.83	25
H-L 24 °C BMG 48 h	1	29.20	25
H-L 24 °C BMG 48 h	3	29.78	25
H-L 24 °C BMLac 0 h	3	28.83	5
H-L 24 °C BMLac 24 h	3	26.31	25
H-L 24 °C BMLac 48 h	1	28.89	25
H-L 24 °C BMLac 48 h	3	27.96	25
H-C 30 °C BMG 0 h	1	27.15	5
H-C 30 °C BMG 48 h	1	29.86	25
H-C 24 °C BMG 0 h	2	28.80	5
H-C 24 °C BMG 24 h	2	30.55	25

**Tabla 117.** Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis de los genes heterólogos regulados por  $P_{AOXI}$ ,  $FTEII$  y  $HGH$ , de las muestras de cultivos de inducción.

<b>Gen <i>FTEII</i></b>						
<b>Condición de cultivo</b>	<b>Matraz</b>	<b><math>C_T</math> 1</b>	<b><math>C_T</math> 2</b>	<b>Media</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Dilución</b>
F-L 30 °C BMG 0 h	2	25.41	25.66	25.54	0.69	5
F-L 30 °C BMG 24 h	2	22.99	23.17	23.08	0.55	25
F-L 30 °C BMG 48 h	1	25.45	25.38	25.42	0.19	25
F-L 30 °C BMG 48 h	2	22.68	23.57	23.13	2.72	25
F-L 30 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	26.52	26.74	26.63	0.58	25
F-L 30 °C BMLac 0 h	2	26.78	26.78	26.78	0.00	25
F-L 30 °C BMLac 24 h	2	21.93	22.41	22.17	1.53	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	1	26.80	26.77	26.79	0.08	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	2	27.74	26.87	27.31	2.25	25
F-L 24 °C BMG 0 h	2	26.76	26.70	26.73	0.16	5
F-L 24 °C BMG 24 h	2	24.81	24.85	24.83	0.11	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	26.73	26.84	26.79	0.29	25
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	26.94	27.48	27.21	1.40	5
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	22.11	22.33	22.22	0.70	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	1	26.98	27.23	27.11	0.65	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	2	27.86	27.83	27.85	0.08	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	26.75	27.31	27.03	1.46	25
F-C 30 °C BMG 0 h	2A	27.35	ND	27.35	ND	5
F-C 30 °C BMG 0 h	2B	26.43	26.51	26.47	0.21	5
F-C 30 °C BMG 24 h	2R	25.62	25.83	25.73	0.58	25
F-C 24 °C BMG 0 h	2A	26.38	ND	26.38	ND	5
F-C 24 °C BMG 0 h	2B	26.10	26.49	26.30	1.05	5
F-C 24 °C BMG 24 h	2	23.54	23.72	23.63	0.54	25
<b>Gen <i>HGH</i></b>						
<b>Condición de cultivo</b>	<b>Matraz</b>	<b><math>C_T</math> 1</b>	<b><math>C_T</math> 2</b>	<b>Media</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Dilución</b>
H-L 30 °C BMG 0 h	2	26.33	25.98	26.16	0.95	25
H-L 30 °C BMG 0 h	3	25.30	25.63	25.47	0.92	25
H-L 30 °C BMG 24 h	2	25.20	25.01	25.11	0.54	625
H-L 30 °C BMG 24 h	3	24.59	24.54	24.57	0.14	625
H-L 30 °C BMG 48 h	2	25.99	26.26	26.13	0.73	125
H-L 30 °C BMG 48 h	3	26.34	26.35	26.35	0.03	125
H-L 30 °C BMLac 0 h	2	24.78	25.29	25.04	1.44	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	3	25.90	26.13	26.02	0.63	25
H-L 30 °C BMLac 24 h	3	30.28	29.88	30.08	0.94	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	1	24.90	25.04	24.97	0.40	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	2	24.90	24.89	24.90	0.03	125
H-L 30 °C BMLac 48 h	3	26.31	26.59	26.45	0.75	125
H-L 24 °C BMG 0 h	3	25.72	25.95	25.84	0.63	25
H-L 24 °C BMG 24 h	3	25.86	25.94	25.90	0.22	625
H-L 24 °C BMG 48 h	1	25.39	25.69	25.54	0.83	25
H-L 24 °C BMG 48 h	3	24.89	25.04	24.97	0.42	25
H-L 24 °C BMLac 0 h	3	27.35	27.33	27.34	0.05	25
H-L 24 °C BMLac 24 h	3	26.26	26.20	26.23	0.16	625
H-L 24 °C BMLac 48 h	1	28.19	28.07	28.13	0.30	125
H-L 24 °C BMLac 48 h	3	27.04	27.59	27.32	1.42	125
H-C 30 °C BMG 0 h	1	26.03	25.97	26.00	0.16	25
H-C 30 °C BMG 48 h	1	26.52	26.64	26.58	0.32	125
H-C 24 °C BMG 0 h	2	26.13	26.29	26.21	0.43	25
H-C 24 °C BMG 24 h	2	24.20	24.31	24.26	0.32	25

**Tabla 118.** Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis del gen *AOX2* de las muestras de cultivos de inducción.

<b>Gen <i>AOX2</i></b>						
<b>Condición de cultivo</b>	<b>Matraz</b>	<b><math>C_T</math> 1</b>	<b><math>C_T</math> 2</b>	<b>Media</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Dilución</b>
F-L 30 °C BMG 0 h	2	31.69	31.36	31.53	0.74	25
F-L 30 °C BMG 24 h	2	25.77	25.91	25.84	0.38	25
F-L 30 °C BMG 48 h	1	29.41	28.35	28.88	2.60	25
F-L 30 °C BMG 48 h	2	26.46	27.43	26.95	2.55	25
F-L 30 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	28.99	29.42	29.21	1.04	25
F-L 30 °C BMLac 0 h	2	30.23	29.38	29.81	2.02	25
F-L 30 °C BMLac 24 h	2	24.42	24.79	24.61	1.06	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	1	29.76	29.41	29.59	0.84	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	2	31.21	31.05	31.13	0.36	25
F-L 24 °C BMG 0 h	2	31.28	30.54	30.91	1.69	25
F-L 24 °C BMG 24 h	2	26.44	26.22	26.33	0.59	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	28.08	28.28	28.18	0.50	25
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	32.35	31.96	32.16	0.86	25
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	24.26	24.62	24.44	1.04	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	1	30.43	30.10	30.27	0.77	125
F-L 24 °C BMLac 48 h	2	29.31	29.41	29.36	0.24	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	28.28	27.96	28.12	0.80	25
F-C 30 °C BMG 0 h	2A	<i>32.90</i>	<i>32.13</i>	32.52	1.67	5
F-C 30 °C BMG 0 h	2B	30.26	30.69	30.48	1.00	25
F-C 30 °C BMG 24 h	2R	27.51	27.60	27.56	0.23	25
F-C 24 °C BMG 0 h	2A	31.33	31.54	31.44	0.47	25
F-C 24 °C BMG 0 h	2B	28.36	28.74	28.55	0.94	5
F-C 24 °C BMG 24 h	2	24.52	24.84	24.68	0.92	25
H-L 30 °C BMG 0 h	2	29.87	29.73	29.80	0.33	5
H-L 30 °C BMG 0 h	3	29.82	29.68	29.75	0.33	1
H-L 30 °C BMG 24 h	2	24.97	25.28	25.13	0.87	25
H-L 30 °C BMG 24 h	3	24.63	24.68	24.66	0.14	25
H-L 30 °C BMG 48 h	2	28.35	27.94	28.15	1.03	25
H-L 30 °C BMG 48 h	3	28.84	28.98	28.91	0.34	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	2	30.16	29.51	29.84	1.54	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	3	31.59	32.35	31.97	1.68	5
H-L 30 °C BMLac 24 h	3	31.82	31.70	31.76	0.27	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	1	30.79	30.88	30.84	0.21	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	2	26.80	26.80	26.80	0.00	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	3	29.26	29.25	29.26	0.02	25
H-L 24 °C BMG 0 h	3	30.70	31.18	30.94	1.10	5
H-L 24 °C BMG 24 h	3	30.66	30.59	30.63	0.16	5
H-L 24 °C BMG 48 h	1	27.62	27.23	27.43	1.01	5
H-L 24 °C BMG 48 h	3	29.99	29.79	29.89	0.47	5
H-L 24 °C BMLac 0 h	3	31.15	31.02	31.09	0.30	5
H-L 24 °C BMLac 24 h	3	32.03	31.92	31.98	0.24	25
H-L 24 °C BMLac 48 h	1	26.22	25.98	26.10	0.65	5
H-L 24 °C BMLac 48 h	3	30.82	30.69	30.76	0.30	25
H-C 30 °C BMG 0 h	1	30.79	30.58	30.69	0.48	5
H-C 30 °C BMG 48 h	1	30.41	30.88	30.65	1.08	25
H-C 24 °C BMG 0 h	2	31.13	31.12	31.13	0.02	5
H-C 24 °C BMG 24 h	2	28.50	28.92	28.71	1.03	25

Los valores de  $C_T$  en *itálicas* se encuentran fuera del intervalo de linealidad del gen.

**Tabla 119.** Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ), media y CV (%) del análisis del gen *DAS* de las muestras de cultivos de inducción.

Condición de cultivo	Matraz	Gen <i>DAS</i>		Media	CV (%)	Dilución
		$C_T$ 1	$C_T$ 2			
F-L 30 °C BMG 0 h	2	29.08	29.15	29.12	0.17	25
F-L 30 °C BMG 24 h	2	21.54	21.69	21.62	0.49	25
F-L 30 °C BMG 48 h	1	24.43	24.69	24.56	0.75	1
F-L 30 °C BMG 48 h	2	24.33	24.18	24.26	0.44	25
F-L 30 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	28.16	28.17	28.17	0.03	5
F-L 30 °C BMLac 0 h	2	27.10	27.51	27.31	1.06	25
F-L 30 °C BMLac 24 h	2	20.65	20.91	20.78	0.88	25
F-L 30 °C BMLac 48 h	1	27.31	27.34	27.33	0.08	5
F-L 30 °C BMLac 48 h	2	28.25	28.42	28.34	0.42	5
F-L 24 °C BMG 0 h	2	28.86	28.78	28.82	0.20	25
F-L 24 °C BMG 24 h	2	26.27	26.29	26.28	0.05	25
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	27.40	27.34	27.37	0.16	5
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	27.00	26.92	26.96	0.21	5
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	21.22	21.12	21.17	0.33	25
F-L 24 °C BMLac 48 h	1	27.17	27.14	27.16	0.08	5
F-L 24 °C BMLac 48 h	2	28.83	28.39	28.61	1.09	5
F-L 24 °C BMG (+CaCl <sub>2</sub> ) 48 h	1	27.42	27.58	27.50	0.41	5
F-C 30 °C BMG 0 h	2A	<i>31.71</i>	<i>31.72</i>	31.72	0.02	1
F-C 30 °C BMG 0 h	2B	28.64	28.69	28.67	0.12	1
F-C 30 °C BMG 24 h	2R	27.17	27.84	27.51	1.72	25
F-C 24 °C BMG 0 h	2A	26.00	26.37	26.19	1.00	1
F-C 24 °C BMG 0 h	2B	28.96	28.87	28.92	0.22	5
F-C 24 °C BMG 24 h	2	25.44	25.66	25.55	0.61	25
H-L 30 °C BMG 0 h	2	28.09	27.93	28.01	0.40	5
H-L 30 °C BMG 0 h	3	28.12	28.10	28.11	0.05	5
H-L 30 °C BMG 24 h	2	21.23	21.58	21.41	1.16	25
H-L 30 °C BMG 24 h	3	20.92	21.13	21.03	0.71	25
H-L 30 °C BMG 48 h	2	27.59	27.31	27.45	0.72	25
H-L 30 °C BMG 48 h	3	27.30	27.93	27.62	1.61	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	2	29.25	29.12	29.19	0.31	25
H-L 30 °C BMLac 0 h	3	27.19	27.10	27.15	0.23	5
H-L 30 °C BMLac 24 h	3	29.22	29.57	29.40	0.84	5
H-L 30 °C BMLac 48 h	1	28.08	28.04	28.06	0.10	5
H-L 30 °C BMLac 48 h	2	26.83	26.69	26.76	0.37	25
H-L 30 °C BMLac 48 h	3	27.28	27.36	27.32	0.21	25
H-L 24 °C BMG 0 h	3	28.45	28.83	28.64	0.94	25
H-L 24 °C BMG 24 h	3	27.94	28.10	28.02	0.40	25
H-L 24 °C BMG 48 h	1	27.68	28.07	27.88	0.99	5
H-L 24 °C BMG 48 h	3	28.48	28.28	28.38	0.50	5
H-L 24 °C BMLac 0 h	3	28.29	28.38	28.34	0.22	25
H-L 24 °C BMLac 24 h	3	22.25	22.66	22.46	1.29	25
H-L 24 °C BMLac 48 h	1	27.95	27.92	27.94	0.08	5
H-L 24 °C BMLac 48 h	3	26.97	26.71	26.84	0.68	5
H-C 30 °C BMG 0 h	1	28.84	28.81	28.83	0.07	5
H-C 30 °C BMG 48 h	1	27.85	28.05	27.95	0.51	25
H-C 24 °C BMG 0 h	2	29.09	29.13	29.11	0.10	5
H-C 24 °C BMG 24 h	2	27.65	27.97	27.81	0.81	25

Los valores de  $C_T$  en *itálicas* se encuentran fuera del intervalo de linealidad del gen.

**Tabla 120.** Niveles transcripcionales de los genes analizados, normalizados respecto a la muestra calibradora y al gen en estudio.

Condición de cultivo	M	Niveles transcripcionales normalizados respecto a la muestra calibradora* y al gen en estudio							
		<i>G6PD</i>	<i>YPT1</i>	<i>GAP</i>	<i>LAC4</i>	<i>aox1::ARG4</i>	<i>FTEII / HGH**</i>	<i>AOX2</i>	<i>DAS</i>
<b>F-L 30 °C BMG 0 h</b>	<b>2</b>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
F-L 30 °C BMG 24 h	2	1.036	0.965	0.081	0.203	7.386	27.982	49.507	138.127
F-L 30 °C BMG 48 h	1	1.061	0.943	0.155	0.199	5.140	6.458	6.956	0.889
F-L 30 °C BMG 48 h	2	1.210	0.827	0.099	0.107	3.608	13.049	11.388	12.187
F-L 30 °C BMG (+Ca) 48 h	1	0.929	1.076	0.073	0.089	3.073	2.970	5.710	0.448
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	1.066	0.938	0.591	1.073	0.206	1.366	1.942	1.972
F-L 30 °C BMLac 24 h	2	1.069	0.935	0.112	0.262	12.860	37.220	82.624	173.024
F-L 30 °C BMLac 48 h	1	1.247	0.802	0.176	0.247	4.893	5.364	8.861	1.535
F-L 30 °C BMLac 48 h	2	0.836	1.196	0.105	0.051	2.633	2.880	2.389	0.606
F-L 24 °C BMG 0 h	2	1.110	0.901	0.539	0.973	2.041	0.321	1.058	0.849
F-L 24 °C BMG 24 h	2	1.232	0.812	0.139	0.368	1.277	3.301	13.256	2.567
F-L 24 °C BMG (+Ca) 48 h	1	1.188	0.842	0.163	0.155	2.228	2.304	9.705	0.640
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	1.165	0.858	1.659	3.342	1.376	0.398	0.784	0.951
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	1.226	0.815	0.213	0.212	15.180	36.951	94.608	138.187
F-L 24 °C BMLac 48 h	1	2.011	0.497	0.241	0.300	2.019	2.225	14.403	0.876
F-L 24 °C BMLac 48 h	2	1.316	0.760	0.125	0.064	1.647	1.548	5.947	0.389
F-L 24 °C BMG (+Ca) 48 h	1	1.517	0.659	0.449	0.245	0.891	1.457	7.497	0.437
F-C 30 °C BMG 0 h	2A	0.517	1.935	8.057	NA	9.697	7.063	2.398	0.175
F-C 30 °C BMG 0 h	2B	1.488	0.672	2.691	NA	2.112	2.266	8.416	0.223
F-C 30 °C BMG 24 h	2R	1.229	0.814	0.203	NA	1.471	1.982	6.324	1.262
F-C 24 °C BMG 0 h	2A	1.186	0.843	1.175	NA	2.127	0.602	1.111	0.275
F-C 24 °C BMG 0 h	2B	1.076	0.929	0.859	NA	1.343	0.672	1.604	0.251
F-C 24 °C BMG 24 h	2	1.267	0.789	0.349	NA	2.934	32.945	181.005	18.653
<b>H-L 30 °C BMG 0 h</b>	<b>2</b>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
H-L 30 °C BMG 0 h	3	0.680	1.470	4.243	0.479	1.010	2.252	0.291	1.320
H-L 30 °C BMG 24 h	2	0.913	1.096	0.152	0.072	10.235	17.441	38.442	118.354
H-L 30 °C BMG 24 h	3	0.771	1.296	0.388	0.106	13.905	27.614	57.630	165.559
H-L 30 °C BMG 48 h	2	0.937	1.067	0.724	0.052	3.926	1.812	5.348	2.543
H-L 30 °C BMG 48 h	3	0.796	1.257	0.115	0.032	4.232	1.496	3.080	2.193
H-L 30 °C BMLac 0 h	2	0.753	1.328	1.005	0.646	0.435	0.999	2.276	1.096
H-L 30 °C BMLac 0 h	3	0.844	1.184	2.861	0.440	0.181	0.700	0.150	1.108
H-L 30 °C BMLac 24 h	3	0.470	2.127	1.463	0.116	43.748	2.965	58.181	17.656
H-L 30 °C BMLac 48 h	1	0.554	1.806	0.727	0.026	3.625	2.752	3.081	1.189
H-L 30 °C BMLac 48 h	2	0.826	1.211	0.724	0.086	7.459	4.261	13.332	4.030
H-L 30 °C BMLac 48 h	3	0.746	1.341	0.289	0.062	5.925	1.912	3.361	3.640
H-L 24 °C BMG 0 h	3	0.827	1.209	2.592	0.238	1.801	1.941	0.730	5.210
H-L 24 °C BMG 24 h	3	0.720	1.388	0.672	0.036	31.909	35.205	0.683	5.881
H-L 24 °C BMG 48 h	1	1.109	0.902	0.518	0.047	5.258	2.655	8.501	1.905
H-L 24 °C BMG 48 h	3	1.052	0.951	0.203	0.014	2.333	2.542	1.065	0.891
H-L 24 °C BMLac 0 h	3	0.861	1.162	2.109	0.365	0.811	0.472	0.450	4.297
H-L 24 °C BMLac 24 h	3	0.885	1.131	0.800	0.051	13.323	16.044	0.793	119.396
H-L 24 °C BMLac 48 h	1	0.734	1.362	1.280	0.117	7.933	2.806	25.344	2.260
H-L 24 °C BMLac 48 h	3	0.843	1.186	0.394	0.032	4.457	1.500	1.749	1.400
H-C 30 °C BMG 0 h	1	1.262	0.793	7.133	NA	2.752	1.339	0.668	0.714
H-C 30 °C BMG 48 h	1	1.038	0.964	0.748	NA	3.028	5.784	4.399	8.028
H-C 24 °C BMG 0 h	2	0.903	1.107	3.179	NA	1.186	1.463	0.628	0.750
H-C 24 °C BMG 24 h	2	0.949	1.054	1.047	NA	3.389	9.883	28.007	15.403

\*Los valores presentados solo pueden compararse entre las condiciones: 1) de las cepas KM71FTEII-LAC (F-L) y KM71FTEII (F-C), ambas normalizadas empleando como muestra calibradora la muestra del matraz 2 de la condición F-L 30 °C BMG 0 h (marcada en negritas) o 2) de las cepas KM71HGH22K-LAC (H-L) y KM71HGH22K (H-C), ambas normalizadas empleando como muestra calibradora la muestra del matraz 2 de la condición H-L 30 °C BMG 0 h (marcada en negritas). Los valores solo pueden compararse contra los del mismo gen evaluado, ya que los valores de cada gen están normalizados contra los valores de ese mismo gen en la muestra calibradora. No se pueden comparar los valores entre dos genes distintos, para esto, emplear los valores de cuantificación absoluta de la **Tabla 121**.

\*\*En la columna de los valores *FTEII / HGH*, en las condiciones de las cepas F-L y H-L se muestran los valores de *FTEII* y en las de las cepas H-L y H-C se muestran los valores de *HGH*.

M: matraz, (+Ca): cultivadas en medio de inducción BMM+CaCl<sub>2</sub>, NA: no aplica (no presentan el gen).

**Tabla 121.** Niveles transcripcionales absolutos de los genes analizados, empleados para las comparaciones entre genes.

Condición de cultivo	M	Niveles transcripcionales absolutos empleados para las comparaciones entre genes							
		<i>G6PD</i>	<i>YPTI</i>	<i>GAP</i>	<i>LAC4</i>	<i>aox1::ARG4</i>	<i>FTEII / HGH**</i>	<i>AOX2</i>	<i>DAS</i>
F-L 30 °C BMG 0 h	2	0.554	0.721	65.793	2.301	3.144	0.607	0.066	0.042
F-L 30 °C BMG 24 h	2	0.510	0.616	4.941	0.417	0.829	2.946	2.904	6.136
F-L 30 °C BMG 48 h	1	0.490	0.562	8.800	0.383	2.707	0.656	0.383	0.864
F-L 30 °C BMG 48 h	2	1.292	1.136	12.433	0.458	4.214	2.862	1.391	1.058
F-L 30 °C BMG (+Ca) 48 h	1	0.418	0.633	4.117	0.168	1.588	0.300	0.309	0.078
F-L 30 °C BMLac 0 h	2	0.981	1.124	12.930	0.800	1.047	0.273	0.207	0.139
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	0.730	0.828	9.241	0.733	1.968	5.290	6.612	10.698
F-L 30 °C BMLac 48 h	1	0.276	0.223	4.974	0.234	1.265	0.272	0.240	0.137
F-L 30 °C BMLac 48 h	2	0.244	0.458	3.933	0.064	0.902	0.195	0.086	0.070
F-L 24 °C BMG 0 h	2	0.894	0.939	50.687	0.638	9.138	0.282	0.099	0.051
F-L 24 °C BMG 24 h	2	1.724	1.463	22.433	2.037	1.930	0.956	2.095	0.275
F-L 24 °C BMG (+Ca) 48 h	1	0.634	0.574	10.563	0.340	1.341	0.272	0.611	0.133
F-L 24 °C BMLac 0 h	2	0.541	0.509	18.689	1.290	3.628	0.207	0.043	0.175
F-L 24 °C BMLac 24 h	2	0.820	0.697	17.003	0.578	11.327	5.123	7.380	8.251
F-L 24 °C BMLac 48 h	1	0.517	0.376	6.068	0.104	0.737	0.137	0.278	0.058
F-L 24 °C BMLac 48 h	2	0.916	0.273	13.099	0.555	1.020	0.221	0.152	0.154
F-L 24 °C BMG (+Ca) 48 h	1	1.118	0.607	38.418	0.726	0.723	0.232	0.636	0.122
F-C 30 °C BMG 0 h	2A	0.010	0.286	23.252	NA	1.315	0.189	0.034	0.007
F-C 30 °C BMG 0 h	2B	0.188	0.104	42.643	NA	1.588	0.333	0.132	0.056
F-C 30 °C BMG 24 h	2R	1.588	1.354	30.084	NA	2.060	0.538	0.926	0.122
F-C 24 °C BMG 0 h	2A	0.632	0.574	73.747	NA	6.390	0.353	0.070	0.293
F-C 24 °C BMG 0 h	2B	0.539	0.601	51.353	NA	3.822	0.373	0.477	0.048
F-C 24 °C BMG 24 h	2	0.364	0.286	12.474	NA	0.975	2.068	6.289	0.447
H-L 30 °C BMG 0 h	2	0.861	0.719	23.101	2.627	2.007	0.557	0.208	0.087
H-L 30 °C BMG 0 h	3	0.403	0.753	68.419	0.894	1.440	0.898	0.215	0.081
H-L 30 °C BMG 24 h	2	2.407	2.471	10.426	0.553	2.408	1.151	4.676	7.056
H-L 30 °C BMG 24 h	3	1.834	2.680	23.945	0.746	2.985	1.673	6.395	9.088
H-L 30 °C BMG 48 h	2	2.374	2.304	46.567	0.383	4.439	0.569	0.625	0.126
H-L 30 °C BMG 48 h	3	2.090	2.865	7.928	0.245	4.990	0.489	0.376	0.113
H-L 30 °C BMLac 0 h	2	1.422	2.177	49.222	0.728	0.375	1.209	0.203	0.040
H-L 30 °C BMLac 0 h	3	1.157	1.388	20.812	1.815	0.572	0.614	0.049	0.155
H-L 30 °C BMLac 24 h	3	0.041	0.164	0.830	0.007	0.082	0.037	0.056	0.035
H-L 30 °C BMLac 48 h	1	0.380	2.587	45.814	0.622	8.289	1.331	1.532	0.200
H-L 30 °C BMLac 48 h	2	1.403	2.193	14.398	0.346	5.089	0.454	0.298	0.138
H-L 30 °C BMLac 48 h	3	0.374	1.081	13.801	0.055	1.185	1.264	0.104	0.084
H-L 24 °C BMG 0 h	3	0.443	0.548	38.044	0.401	2.316	0.695	0.097	0.057
H-L 24 °C BMG 24 h	3	0.512	0.851	13.228	0.081	10.822	0.665	0.120	0.086
H-L 24 °C BMG 48 h	1	0.536	0.357	6.982	0.070	1.208	0.852	1.010	0.095
H-L 24 °C BMG 48 h	3	0.798	0.599	4.267	0.033	0.829	1.269	0.195	0.068
H-L 24 °C BMLac 0 h	3	0.693	0.793	45.517	0.907	1.537	0.246	0.088	0.070
H-L 24 °C BMLac 24 h	3	1.141	1.240	27.281	0.198	7.920	0.529	0.049	3.508
H-L 24 °C BMLac 48 h	1	0.280	0.442	13.846	0.143	1.478	0.142	2.442	0.091
H-L 24 °C BMLac 48 h	3	1.110	1.335	13.891	0.127	2.707	0.250	0.110	0.189
H-C 30 °C BMG 0 h	1	0.903	0.462	27.281	NA	4.586	0.620	0.115	0.050
H-C 30 °C BMG 48 h	1	0.568	0.436	11.312	NA	0.787	0.415	0.118	0.090
H-C 24 °C BMG 0 h	2	0.500	0.515	47.798	NA	1.568	0.536	0.086	0.042
H-C 24 °C BMG 24 h	2	0.287	0.265	9.062	NA	0.502	2.073	0.429	0.099

\*Los valores presentados pueden compararse entre todos los genes evaluados, y todas las cepas (KM71FTEII-LAC [F-L], KM71FTEII [F-C], KM71HGH22K-LAC [H-L] y KM71HGH22K [H-C]), y las condiciones presentadas.

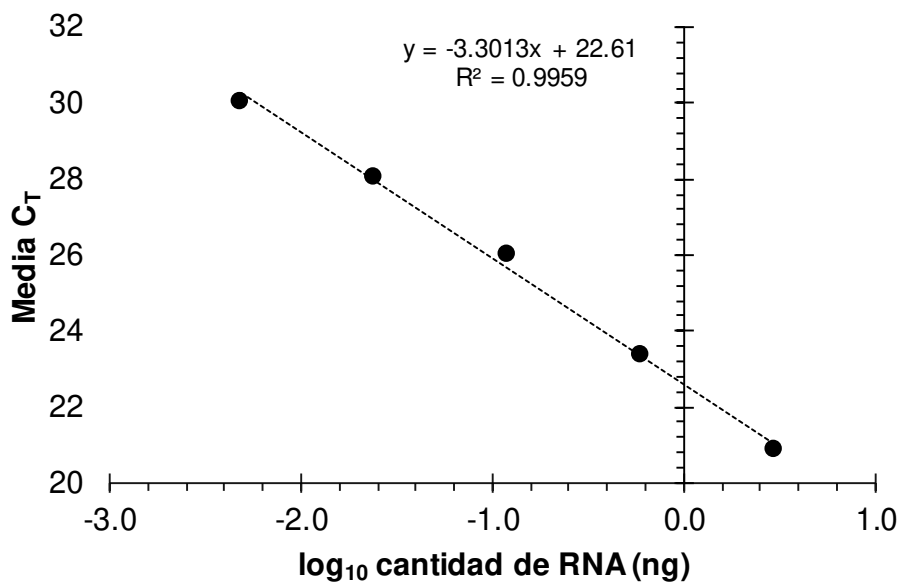
\*\*En la columna de los valores *FTEII / HGH*, en las condiciones de las cepas F-L y H-L se muestran los valores de *FTEII* y en las de las cepas H-L y H-C se muestran los valores de *HGH*.

M: matraz, (+Ca): cultivadas en medio de inducción BMM+CaCl<sub>2</sub>, NA: no aplica (no presentan el gen).

**Tabla 122.** Datos empleados en el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen *LAC4*.

Gen <i>LAC4</i>						
Dilución*	Cantidad de RNA (ng)	log <sub>10</sub> cantidad de RNA (ng)	C <sub>T</sub> 1	C <sub>T</sub> 2	Media	CV (%)
1:5	3	0.477	20.79	20.90	20.85	0.37
1:25	0.6	-0.222	23.45	23.22	23.34	0.70
1:125	0.12	-0.921	25.90	26.10	26.00	0.54
1:625	0.024	-1.620	28.07	28.01	28.04	0.15
1:3125	0.0048	-2.319	29.98	30.08	30.03	0.24

\*La muestra empleada fue la de la cepa KM71FTEII-LAC cultivada en BMLac inicial a 24 °C a 24 h de inducción (matraz 2). Se consideró un umbral de C<sub>T</sub> de 2000.



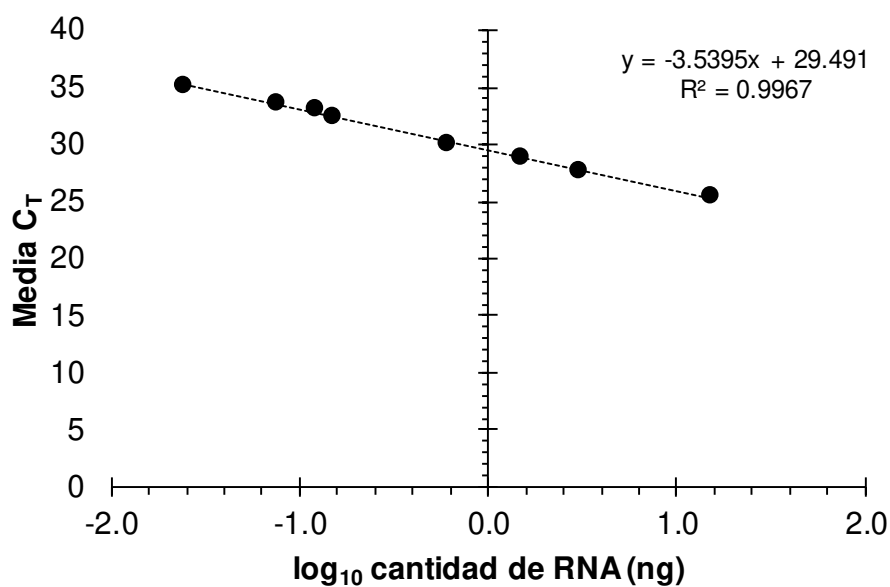
**Figura 106.** Gráfica empleada en el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen *LAC4*.



**Tabla 123.** Datos empleados en el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen *aox1::ARG4*.

<b>Gen <i>aox1::ARG4</i></b>						
<b>Dilución*</b>	<b>ng de RNA</b>	<b>log<sub>10</sub> ng de RNA</b>	<b>C<sub>T</sub> 1</b>	<b>C<sub>T</sub> 2</b>	<b>Media</b>	<b>CV (%)</b>
Muestra directa	15	1.176	25.50	25.43	25.47	0.19
1:5	3	0.477	27.78	27.62	27.70	0.41
1:10	1.5	0.176	28.91	28.85	28.88	0.15
1:25	0.6	-0.222	30.13	29.79	29.96	0.80
1:100	0.15	-0.824	32.47	32.30	32.39	0.37
1:125	0.12	-0.921	32.88	33.23	33.06	0.75
1:200	0.075	-1.125	33.07	34.11	33.59	2.19
1:625	0.024	-1.620	35.47	34.72	35.10	1.51

\*La muestra empleada fue la de la cepa KM71HGH22K cultivada en BMG inicial a 30 °C a las 48 h de inducción (matraz 1). Se consideró un umbral de C<sub>T</sub> de 2000.



**Figura 107.** Gráfica empleada en el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen *aox1::ARG4*.

## BIBLIOGRAFÍA

Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Čech M et al. 2016. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research* 44: W3–W10.

Araujo K, Páez G, Mármol Z, Ferrer J, Ramones E, Aiello Mazzarri C, Rincón M. 2007. Effect of lactose concentration on the grow kinetics of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* and production of  $\beta$ -D-galactosidase (E.C. 3.2.1.23). *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia* 30: 64–73.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM et al. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics* 25: 25–9.

Ata Ö, Rebnegger C, Tatto NE, Valli M, Mairinger T, Hann S, Steiger MG, Çalık P, Mattanovich D. 2018. A single Gal4-like transcription factor activates the Crabtree effect in *Komagataella phaffii*. *Nature Communications* 9: 4911.

Balderas-Cisneros F de J. 2016. Producción de (hGH-22K) en una cepa de *Pichia pastoris* KM71 capaz de emplear la lactosa como fuente de carbono. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Baumann K, Carnicer M, Dragosits M, Graf AB, Stadlmann J, Jouhten P et al. 2010. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC Systems Biology* 4: 141.

Baumann K, Dato L, Graf AB, Frascotti G, Dragosits M, Porro D, Mattanovich D, Ferrer P, Branduardi P. 2011. The impact of oxygen on the transcriptome of recombinant *S. cerevisiae* and *P. pastoris* - a comparative analysis. *BMC genomics* 12: 218.

Bawa Z, Routledge SJ, Jamshad M, Clare M, Sarkar D, Dickerson I, Ganzlin M, Poyner DR, Bill RM. 2014. Functional recombinant protein is present in the pre-induction phases of *Pichia pastoris* cultures when grown in bioreactors , but not shake-flasks. *Microbial Cell Factories* 13: 1–13.

Beccerra M, Díaz-Prado S, Rodríguez-Belmonte E, Cerdán ME, González-Siso MI. 2002. Metabolic engineering for direct lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 24: 1391–1396.

Becerra M, Cerdán E, Gonzalez MI. 1997. Heterologous *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase production and release by *Saccharomyces cerevisiae* osmotic-remedial thermosensitive autolytic mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1335: 235–241.

Becerra M, Díaz-Prado S, Cerdán E, González-Siso MI, Díaz Prado S, Cerdán E, González Siso MI. 2001. Heterologous *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase secretion by *Saccharomyces cerevisiae* super-secreting mutants. *Biotechnology Letters* 23: 33–40.

Becerra M, Rodríguez-Belmonte E, Cerdán ME, González-Siso MI. 2004. Engineered autolytic yeast secreting *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase for production of heterologous proteins in lactose media. *Journal of Biotechnology* 109: 131–137.

- Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A et al. 2009. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25: 1091–1093.
- Blankenberg D, Gordon A, Von Kuster G, Coraor N, Taylor J, Nekrutenko A, Team G. 2010. Manipulation of FASTQ data with galaxy. *Bioinformatics* 26: 1783–1785.
- Bosso A, Morioka LRI, Santos LF dos, Suguimoto HH. 2016. Lactose hydrolysis potential and thermal stability of commercial  $\beta$ -galactosidase in UHT and skimmed milk. *Food Science and Technology* 36: 159–165.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Brito PSD. 2013. Review of Cheese Whey Recovery Technologies. In: Culleri JC (ed) *Recycling: Technological Systems, Management Practices and Environmental Impact*, 119–144.
- BusinessWire. 2017. Global Lactose-free Food Market - Drivers and Forecasts by Technavio.
- Carvalho F, Prazeres AR, Rivas J. 2013. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the Total Environment* 445–446: 385–396.
- Cavaille D, Combes D. 1995. Characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 22: 55–64.
- Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Engineering* 13: 329–332.
- Cereghino GPL, Cregg JM. 1999. Applications of yeast in biotechnology : protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 422–427.
- Cereghino JL, Cregg JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 45–66.
- Choudhury BI, Whiteway M. 2018. Evolutionary Transition of GAL Regulatory Circuit from Generalist to Specialist Function in Ascomycetes. *Trends in Microbiology* 26: 692–702.
- Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA. 1989. Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology* 9: 1316–1323.
- Daly R, Hearn MTW. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition* 18: 119–138.
- Dickson RC. 1980. Expression of a foreign eukaryotic gene in *Saccharomyces cerevisiae*:  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Gene* 10: 347–356.

Domingues L, Guimarães PMR, Oliveira C. 2010. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose / whey fermentation. *Bioengineered Bugs* 1: 1–8.

Domingues L, Teixeira JA, Lima N. 1999. Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* fermenting lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 621–626.

Dragosits M, Pflügl S, Kurz S, Razzazi-fazeli E, Wilson IBH. 2014. Recombinant *Aspergillus*  $\beta$ -galactosidases as a robust glycomic and biotechnological tool. : 3553–3567.

Ecamilla-Treviño LL, Viader-Salvadó JM, Barrera-Saldaña HA, Guerrero-Olazarán M. 2000. Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology letters* 22: 109–114.

Eda M, Ishimaru M, Tada T. 2015. Expression , purification , crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of tomato  $\beta$ -galactosidase 4. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications* F71: 153–156.

Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters ANNF, Harpold MM, Gingeras TR, Al EET. 1985. Isolation of Alcohol Oxidase and Two Other Methanol Regulatable Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. 5: 1111–1121.

Faber KN, Elgersma Y, Heyman JA, Keller A, Lüers GH, Nuttley WM, Terlecky SR, Wenzel TJ, Subramani S. 1998. Use of *Pichia pastoris* as a Model Eukaryotic System: Peroxisome Biogenesis. In: Higgins DR, Cregg JM (eds) *Pichia Protocols*, 121–148. Humana Press, New Jersey.

Félix-Castro MB. 2013. Análisis de la expresión de genes involucrados en los procesos de secreción, proteólisis y metabolismo del metanol de la cepa KM71FTEII de *Pichia pastoris* cultivada a dos condiciones de cultivo. Universidad Autónoma de Nuevo León: 140 pp.

Fernández-Cano KB. 2015. Análisis transcripcional de la vía de secreción y metabolismo de metanol durante la producción de una proteína heteróloga en *Pichia pastoris*.

Gantulga D, Ahn YO, Zhou C, Battogtokh D, Bevan DR, Winkel BSJ, Esen A. 2009. Comparative characterization of the *Arabidopsis* subfamily a1  $\beta$ -galactosidases. *Phytochemistry* 70: 1999–2009.

Gantulga D, Turan Y, Bevan DR, Esen A. 2008. The *Arabidopsis* At1g45130 and At3g52840 genes encode  $\beta$ -galactosidases with activity toward cell wall polysaccharides. *Phytochemistry* 69: 1661–1670.

Gao P, Ding J, Zhang X, Zhao Y, Zhang M, Gao M, Wu J. 2016. Transcriptome analysis of *Pichia pastoris* in response to ethanol stress. *Chinese Journal of Biotechnology* 32: 584–598.

Geier M, Brandner C, Strohmeier GA, Hall M, Hartner FS, Glieder A. 2015. Engineering *Pichia pastoris* for improved NADH regeneration : A novel chassis strain for whole-cell catalysis. *Beilstein Journal of Organics Chemistry* 11: 1741–1748.

Gmeiner C, Saadati A, Maresch D, Krasteva S, Frank M, Altmann F, Herwig C, Spadiut O. 2015. Development of a fed-batch process for a recombinant *Pichia pastoris* Δoch1 strain expressing a plant peroxidase. *Microbial Cell Factories* 14: 1–10.

Godiska R. 2016. Clone the Unclonable – Vectors and Cells to Capture and Express Problematic DNAs. Lucigen.

Godiska R, Mead D, Dhodda V, Wu C, Hochstein R, Karsi A, Usdin K, Entezam A, Ravin N. 2009. Linear plasmid vector for cloning of repetitive or unstable sequences in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 38: 1–9.

Gould SJ, McCollum D, Spong AP, Heyman JA, Subramani S. 1992. Development of the yeast *Pichia pastoris* as a model organism for a genetic and molecular analysis of peroxisome assembly. *Yeast* 8: 613–628.

Graf A, Gasser B, Dragosits M, Sauer M, Leparac GG, Tüchler T, Kreil DP, Mattanovich D. 2008. Novel insights into the unfolded protein response using *Pichia pastoris* specific DNA microarrays. *BMC genomics* 9: 390.

GrandViewResearch. 2016. Galacto-oligosaccharide (GOS) Market Trend Analysis By Application (Food & Beverage, Dietary Supplements), By Region (North America, Europe, Asia Pacific, Latin America, Middle East & Africa), By Country, And Segment Forecasts, 2018 - 2025.

Guerrero-Olazarán M, Rodríguez-Blanco L, Carreon-Treviño JG, Gallegos-López JA, Viader-Salvadó JM. 2010. Expression of a *Bacillus* phytase C gene in *Pichia pastoris* and properties of the recombinant enzyme. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 5601–8.

Guimarães PMR, Le Berre V, Sokol S, François J, Teixeira JA, Domingues L. 2008a. Comparative transcriptome analysis between original and evolved recombinant lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology Journal* 3: 1591–1597.

Guimarães PMR, François J, Parrou JL, Teixeira JA, Domingues L. 2008b. Adaptive evolution of a lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* recombinant. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1748–1756.

Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L. 2008c. Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 30: 1953–1958.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.

Hartner FS, Glieder A. 2006. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microbial cell factories* 5: 39.

Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Bona R, Rumbold K, Lückl J, Griengl H, Kohlwein SD, Schwab H. 1997. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expression and Purification* 11: 61–71.

Heine RG, Alrefae F, Bachina P, De Leon JC, Geng L, Gong S et al. 2017. Lactose intolerance and gastrointestinal cow's milk allergy in infants and children - Common misconceptions revisited. *World Allergy Organization Journal* 10: 1–8.

Herrera-Estala AL. 2015. Construcción de la cepa KM71FTEIILAC de *Pichia pastoris* y determinación de la dosis génica de los genes integrados. Universidad Autónoma de Nuevo León: 106 pp.

Hesketh AR, Castrillo JI, Sawyer T, Archer DB, Oliver SG. 2013. Investigating the physiological response of *Pichia (Komagataella) pastoris* GS115 to the heterologous expression of misfolded proteins using chemostat cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 9747–9762.

Hildebrandt P, Wanarska M, Kur J. 2009. A new cold-adapted  $\beta$ -D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c – gene cloning, overexpression, purification and properties. *BMC Microbiology* 11: 1–11.

Hu X, Robin S, Connell SO, Walsh G, Wall JG. 2010. Engineering of a fungal  $\beta$ -galactosidase to remove product inhibition by galactose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 1773–1782.

Huang X, Madan A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome research* 9: 868–77.

Huntley RP, Sawford T, Martin MJ, O'Donovan C. 2014. Understanding how and why the Gene Ontology and its annotations evolve: The GO within UniProt. *GigaScience* 3: 1–9.

Husain Q. 2010.  $\beta$  Galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 30: 41–62.

Inan M, Meagher MM. 2001a. Non-Repressing Carbon Sources for Alcohol Oxidase (AOX1) Promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: 585–589.

Inan M, Meagher MM. 2001b. The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: 337–341.

Invitrogen. 2014. *Pichia* Expression Kit. Manual A.0: 100.

Jiang B, Argyros R, Bukowski J, Nelson S, Sharkey N, Kim S et al. 2015. Inactivation of a GAL4 -Like Transcription Factor Improves Cell Fitness and Product Yield in Glycoengineered *Pichia pastoris* Strains (JL Schottel, Ed.). *Applied and Environmental Microbiology* 81: 260–271.

Johnston M. 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* 51: 458–476.

Juers DH, Matthews BW, Huber RE. 2012. LacZ  $\beta$ -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science* 21: 1792–1807.

Jung SJ, Lee BH. 2008. Production and application of galacto-oligosaccharides

from lactose by a recombinant  $\beta$ -galactosidase of *Bifidobacterium infantis* overproduced by *Pichia pastoris*. Food Science and Biotechnology 17: 514–518.

Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. Nucleic Acids Research 44: D457–D462.

Katrolia P, Yan Q, Jia H, Li Y, Jiang Z, Song C. 2011. Molecular cloning and high-level expression of a  $\beta$ -galactosidase gene from *Paecilomyces aeruginus* in *Pichia pastoris*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 69: 112–119.

Kim CS, Ji E, Oh D. 2003. Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase in *Escherichia coli*. Biotechnology Letters 25: 1769–1774.

Kim CS, Ji E, Oh D. 2004. A new kinetic model of recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. Biochemical and Biophysical Research Communications 316: 738–743.

Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. Genome Biology 14: R36.

Klein M, Islam Z, Knudsen PB, Carrillo M, Swinnen S, Workman M, Nevoigt E. 2016. The expression of glycerol facilitators from various yeast species improves growth on glycerol of *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolic Engineering Communications 3: 252–257.

Kotake T, Dina S, Konishi T, Kaneko S, Igarashi K, Samejima M, Watanabe Y, Kimura K, Tsumuraya Y. 2005. Molecular Cloning of a  $\beta$ -Galactosidase from Radish That Specifically Hydrolyzes  $\beta$ -(1→3)- and  $\beta$ -(1→6)- Galactosyl Residues of Arabinogalactan Protein. Plant Physiology 138: 1563–1576.

Küberl A, Schneider J, Thallinger GG, Anderl I, Wibberg D, Hajek T et al. 2011. High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435. Journal of Biotechnology 154: 312–20.

Kurtzman CP. 2005. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 973–976.

Kurtzman CP. 2010. The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th Edition. Elsevier Science.

Larsen S, Weaver J, Campos KDS, Bulahan R, Nguyen J, Grove H et al. 2014. Mutant strains of *Pichia pastoris* with enhanced secretion of recombinant proteins. Biotechnology Letters 35: 1–15.

Li C, Zhang X, Zhang L, Wang A, Mao R, Li G. 2013. Medium optimization for the production of a metagenome- derived  $\beta$  -galactosidase by *Pichia pastoris* using response surface methodology. African Journal of Biochemistry Research 7: 1077–1085.

Liang S, Wang B, Pan L, Ye Y, He M, Han S, Zheng S, Wang X, Lin Y. 2012. Comprehensive structural annotation of *Pichia pastoris* transcriptome and the response to

various carbon sources using deep paired-end RNA sequencing. *BMC Genomics* 13: 738.

Liu A. 2004. Cloning, expression and enzymatic properties of lactase gene from *Kluyveromyces lactis*.

Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 1–11.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25: 402–408.

Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research* 42: D490–D495.

Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, Stenger C, Costa M, Camattari A, Fotiadis D, Kovar K. 2015. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances* 33: 1177–1193.

López M, Loera O, Guerrero-Olazarán M, Viader-Salvadó JM, Gallegos-López JA, Fernández FJ, Favela-Torres E, Viniegra-González G. 2009. Cell growth and *Trametes versicolor* laccase production in transformed *Pichia pastoris* cultured by solid-state or submerged fermentations. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 85:435-440.

Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. 2017. Transcriptomics technologies. *PLoS Computational Biology* 13: 1–23.

Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249–270.

Mahdian SMA, Karimi E, Tanipour MH, Parizadeh SMR, Ghayour-Mobarhan M, Bazaz MM, Mashkani B. 2016. Expression of a functional cold active  $\beta$ -galactosidase from *Planococcus* sp-L4 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 125: 19–25.

Mattanovich D, Graf A, Stadlmann J, Dragosits M, Redl A, Maurer M et al. 2009. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories* 8: 29.

Miller JH. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Michigan.

Moser JW, Prielhofer R, Gerner SM, Graf AB, Wilson IBH, Mattanovich D, Dragosits M. 2017. Implications of evolutionary engineering for growth and recombinant protein production in methanol - based growth media in the yeast *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*: 1–16.

Mutz K-O, Heilkenbrinker A, Lönne M, Walter J-G, Stahl F. 2013. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current Opinion in Biotechnology* 24: 22–30.

Nagalakshmi U, Waern K, Snyder M. 2010. RNA-seq: A method for comprehensive transcriptome analysis. *Current Protocols in Molecular Biology*: 1–13.



Nickerson TA, Vujicic IF, Lin AY. 1975. Colorimetric Estimation of Lactose and Its Hydrolytic Products. *Journal of Dairy Science* 59: 386–390.

Nie Y, Huang M, Lu J, Qian J, Lin W, Chu J, Zhuang Y, Zhang S. 2014. Impacts of high  $\beta$ -galactosidase expression on central metabolism of recombinant *Pichia pastoris* GS115 using glucose as sole carbon source via  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis. *Journal of Biotechnology* 187: 124–134.

Nie C, Liu B, Zhang Y, Zhao G, Fan X, Ning X, Zhang W. 2013. Production and secretion of *Lactobacillus crispatus*  $\beta$ -galactosidase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 92: 88–93.

Nie C, Ning X, Zhang Y, Fan X, Zhao G, Zhang W. 2012. Improvement of Lactase Secretion Level by Fusion Expression with Tag in *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural Science and Technology* 14: 71–77.

Norton PA, Coffin JM. 1985. Bacterial  $\beta$ -galactosidase as a marker of Rous Sarcoma Virus gene expression and replication. *Molecular and Cellular Biology* 5: 281–290.

OECD-FAO. 2016. OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025.

Owczarzy R, Tataurov A V., Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almabrazi HG et al. 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic acids research* 36: 163–169.

Pereira-Rodríguez Á. 2012. Structural characterization of the  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* and expression and directed evolution of  $\beta$ -galactosidases with high biotechnological interest.

Pereira Rodríguez A, Fernández Leiro R, Trillo MC, Cerdán ME, González Siso MI, Becerra M. 2006. Secretion and properties of a hybrid *Kluyveromyces lactis-Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase. *Microbial Cell Factories* 5: 41.

Placzek S, Schomburg I, Chang A, Jeske L, Ulbrich M, Tillack J, Schomburg D. 2017. BRENDA in 2017: New perspectives and new tools in BRENDA. *Nucleic Acids Research* 45: D380–D388.

Prielhofer R, Cartwright SP, Graf AB, Valli M, Bill RM, Mattanovich D, Gasser B. 2015. *Pichia pastoris* regulates its gene-specific response to different carbon sources at the transcriptional, rather than the translational, level. *BMC genomics* 16: 167.

Prielhofer R, Maurer M, Klein J, Wenger J, Kiziak C, Gasser B, Mattanovich D. 2013. Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories* 12: 5.

Prielhofer R, Reichinger M, Wagner N, Claes K, Kiziak C, Gasser B, Mattanovich D. 2018. Superior protein titers in half the fermentation time: Promoter and process engineering for the glucose-regulated GTH1 promoter of *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 115: 2479–2488.

Qi F, Wang C, Liu Y, Kaleem I, Li Q, Li C. 2011. Transcriptional Profiling of Protein Expression Related Genes of *Pichia pastoris* under Simulated Microgravity. *PloS*

one 6.

Qin X, Qian J, Yao G, Zhuang Y, Zhang S, Chu J. 2011. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 3600–3608.

Ramakrishnan S, Hartley BS. 1993. Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4230–4235.

Rebnegger C, Graf AB, Valli M, Steiger MG, Gasser B, Maurer M, Mattanovich D. 2014. In *Pichia pastoris*, growth rate regulates protein synthesis and secretion, mating and stress response. *Biotechnology journal* 9: 511–25.

Rebnegger C, Vos T, Graf AB, Valli M, Pronk JT, Daran-Lapujade P, Mattanovich D. 2016. *Pichia pastoris* exhibits high viability and a low maintenance energy requirement at near-zero specific growth rates. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 4570–4583.

Rigamonte TA, Silveira WB, Fietto LG, Castro IM, Breunig KD, Passos FML. 2011. Restricted sugar uptake by sugar-induced internalization of the yeast lactose/galactose permease Lac12. *FEMS Yeast Research* 11: 243–251.

Rubio-Teixeira M. 2005. A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* 5: 1115–1128.

Rubio-Teixeira M, Castrillo JI, Adam AC, Ugalde UO, Polaina J. 1998. Highly Efficient Assimilation of Lactose by a Metabolically Engineered Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 827–837.

Sampedro J, Gianzo C, Iglesias N, Guitia E, Revilla G, Zarra I. 2012. AtBGAL10 Is the Main Xyloglucan  $\beta$ -Galactosidase in *Arabidopsis*, and Its Absence Results in Unusual Xyloglucan Subunits and Growth Defects. *Plant Physiology* 158: 1146–1157.

Santos AM, Silveira WB, Fietto LG, Brandao RL, Castro IM. 2014. Kinetics and regulation of lactose transport and metabolism in *Kluyveromyces lactis* JA6. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.

Sauer M, Branduardi P, Gasser B, Valli M, Maurer M, Porro D, Mattanovich D. 2004. Differential gene expression in recombinant *Pichia pastoris* analysed by heterologous DNA microarray hybridisation. *Microbial cell factories* 3: 17.

De Schutter K, Lin Y-C, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouz  P, Van de Peer Y, Callewaert N. 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature biotechnology* 27: 561–566.

Schwarzthans J-P, Wibberg D, Winkler A, Luttermann T, Kalinowski J, Friehs K. 2016. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microbial Cell Factories* 15: 84.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N,

Schwikowski B, Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*: 2498–2504.

Shi L, Wang X, Wang J, Zhang P, Qi F, Cai M, Zhang Y, Zhou X. 2017. Transcriptome analysis of  $\Delta$ mig1 $\Delta$ mig2 mutant reveals their roles in methanol catabolism, peroxisome biogenesis and autophagy in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Genes and Genomics* 0: 1–14.

Sinha J, Plantz BA, Inan M, Meagher MM. 2005. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon- $\tau$ . *Biotechnology and Bioengineering* 89: 102–112.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76–85.

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. *Biotechnology journal* 5: 705–715.

Souza Macêdo C. 2001. Transformação de *Pichia pastoris* com o gene de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*. Universidade Federal de Viçosa.

Sreekrishna K, Dickson RC. 1985. Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 7909–7913.

Sun X, Duan X, Wu D, Chen J, Wu J. 2014. Characterization of *Sulfolobus solfataricus*  $\beta$ -galactosidase mutant F441Y expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 1359–1365.

Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. 2011. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE* 6.

Tahoun MK, El-Nemr TM, Shata OH. 1999. Ethanol from lactose in salted cheese whey by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A* 208: 60–64.

Tang S, Boehme L, Lam H, Zhang Z. 2009. *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. *Biochemical Engineering Journal* 43: 157–162.

Tarullo SE. 2014. Expression and Purification of Human Lysosomal  $\beta$ -galactosidase from *Pichia pastoris*.

ThermoFisher Scientific. 2018. *Pichia* Expression Kit, original kit.

Torres DPM, Gonçalves M do PF, Teixeira JA, Rodrigues LR. 2010. Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 438–454.

Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL, Pachter L. 2013. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology* 31: 46–53.

Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR et al. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* 7: 562–78.

Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology* 28: 511–515.

Tuller T, Ruppin E, Kupiec M. 2009. Properties of untranslated regions of the *S. cerevisiae* genome. *BMC Genomics* 10: 1–11.

Tuttle DL, Dunn WA. 1995. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Cell Science* 108 ( Pt 1: 25–35.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40: 1–12.

Usui K, Ohto U, Ochi T, Shimizu T, Satow Y. 2012. Expression , purification , crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human  $\beta$ -galactosidase. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*: 73–77.

Valencia-Denicia E, Ramírez-Castillo ML. 2009. La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos* 73: 27–31.

Viader-Salvadó JM, Gallegos-López JA, Carreón-Treviño JG, Castillo-Galván M, Rojo-Domínguez A, Guerrero-Olazarán M. 2010. Design of thermostable beta-propeller phytases with activity over a broad range of pHs and their overproduction by *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 6423–30.

Viera IC, Sauti M, Mart C, Hern L. 2010. Un acercamiento a la ontología de genes y sus aplicaciones. *Centro Nacional de Genética Médica, Universidad de Ciencias Médicas, MINSAP*: 1–25.

Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. 2003. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 31: 3688–3691.

Vogl T, Glieder A. 2013. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnology* 30: 385–404.

Vogl T, Sturmberger L, Kickenweiz T, Wasmayer R, Schmid C, Hatzl AM et al. 2016. A Toolbox of Diverse Promoters Related to Methanol Utilization: Functionally Verified Parts for Heterologous Pathway Expression in *Pichia pastoris*. *ACS Synthetic Biology* 5: 172–186.

Wanarska M, Kur J. 2012. A method for the production of D-tagatose using a recombinant *Pichia pastoris* strain secreting  $\beta$ -D-galactosidase from *Arthrobacter*

*chlorophenolicus* and a recombinant L-arabinose isomerase from *Arthrobacter* sp. 22c. *Microbial Cell Factories* 11: 113.

Wang K, Li G, Yu SQ, Zhang CT, Liu YH. 2010. A novel metagenome-derived  $\beta$ -galactosidase: Gene cloning, overexpression, purification and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88: 155–165.

Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair S V., Cregg JM. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186: 37–44.

Werten MWT, Van Den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, De Wolf FA. 1999. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* 15: 1087–1096.

Yamashita S, Yurimoto H, Murakami D, Yoshikawa M, Oku M, Sakai Y. 2009. Lag-phase autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Genes to Cells* 14: 861–870.

Yuan T, Yang P, Wang Y, Meng K, Luo H, Zhang W, Wu N, Fan Y, Yao B. 2008. Heterologous expression of a gene encoding a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biotechnology Letters* 30: 343–348.

Zachariae W, Breunig KD. 1993. Expression of the transcriptional activator LAC9 (KIGAL4) in *Kluyveromyces lactis* is controlled by autoregulation. *Molecular and Cellular Biology* 13: 3058–3066.

Zhang W, Fan Y, Yao B. 2005. Overexpression of *Aspergillus candidus* lactase and analysis of enzymatic properties. *Acta Microbiologica Sinica*: 247–252.

Zhang B, Li B, Chen D, Zong J, Sun F, Qu H, Liang C. 2016. Transcriptional regulation of aerobic metabolism in *Pichia pastoris* fermentation. *PLoS ONE* 11: 1–16.

Zhang A-L, Luo J-X, Zhang T-Y, Pan Y-W, Tan Y-H, Fu C-Y, Tu F. 2009. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Reports* 36: 1611–1619.

Zhang P, Zhang W, Zhou X, Bai P, Cregg JM, Zhang Y. 2010. Catabolite Repression of Aox in *Pichia pastoris* Is Dependent on Hexose Transporter PpHxt1 and Pexophagy. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 6108–6118.

Zhao Q, Liu F, Hou Z, Yuan C, Zhu X. 2014. High Level Production of  $\beta$ -Galactosidase Exhibiting Excellent Milk-Lactose Degradation Ability from *Aspergillus oryzae* by Codon and Fermentation Optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

Zhou QZK, Chen XD. 2001. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal* 9: 33–40.

Zolnere K, Ciprovica I. 2017. The comparison of commercially available  $\beta$ -galactosidases for dairy industry: review. 215–222.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Mariana Sánchez Villarreal

Candidata para el Grado de

Doctor en Ciencias con orientación en Biotecnología

Tesis: Efecto de la lactosa en la expresión de genes regulados por el promotor *AOXI* y genes relacionados en cepas de *Pichia pastoris* modificadas para emplear lactosa como fuente de carbono

Campo de estudio: Biotecnología Molecular

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 22 de junio de 1991, hija de Rafael Sánchez González y Leticia Villarreal Sepúlveda.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica en 2014 (cédula profesional 8531085) con Reconocimiento al Mérito Académico 2013 por parte de la UANL.

Experiencia Profesional: Elaboración de tesis de Doctorado en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL (2014-2018), apoyo en actividades de docencia a los profesores investigadores del mencionado laboratorio en materias de pregrado de Ingeniería Genética y Tópicos Selectos en Biotecnología Molecular.