

EXPRESIÓN DE UNA ENZIMA DE FUSIÓN EN *PICHIA PASTORIS* PARA LA SÍNTESIS DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS

Silvia Montiel, Ma. Elena Rodríguez, Ángela Ávila, Jaime R. Porras, Agustín López-Munguía. Instituto de Biotecnología, UNAM.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Cuernavaca., Mor., 62210. montiel@ibt.unam.mx.

Palabras clave: Pichia pastoris, Enzima de fusión, Fructooligosacáridos

Introducción. Los fructooligosacáridos son azúcares complejos de gran importancia en la industria alimentaria debido a sus propiedades prebióticas. En años recientes se ha comprobado que oligosacáridos tipo levana (LFOS) poseen propiedades prebióticas. Porras D. (1), diseñó y expresó el gen que codifica para la enzima de fusión formada por la endolevanasa de *B. licheniformis* (LevB₁) y la levansacarasa (SacB) de *B. subtilis* (**Fig. 1**) para sintetizar LFOS a partir de sacarosa. El objetivo del presente estudio es producir la enzima de fusión LevB₁SaB en el sistema de expresión *P. pastoris* para la síntesis de LFOS, con el objetivo a mediano plazo de realizar un proceso simultáneo de consumo de monosacáridos por la propia *Pichia*.

Metodología. El gen de la enzima de fusión LevB₁SaB fue clonado en los sitios de restricción EcoRI-XbaI en los vectores pPICZαA y pGAPZαA, bajo el control del promotor AOX1 y GAP, respectivamente. Los plásmidos resultantes pPICZαA-LevB₁SaB y pGAPZαA-LevB₁SaB fueron linealizados con SacI y AvrII y empleados para transformar células electrocompetentes de *P. pastoris* X-33. La producción X-33/pPICZαA-LevB₁SaB y X-33/pGAPZαA-LevB₁SaB se llevó a cabo en 0.05 L de fermentación en medio BM-Y metanol 0.5 % y BM-Y glucosa 2%, respectivamente.

Resultados. Los plásmidos pPICZαA y pGAPZαA fueron contruidos para llevar la secuencia de DNA que codifica para LevB₁SaB fusionada al extremo 5' con la secuencia del factor α de *S. cerevisiae* y en el extremo 3' con el epítipo myc y una etiqueta His6. Los dos plásmidos de expresión y los vectores vacíos se linealizaron en la región promotora antes de la transformación de la cepa huésped. Transformación por electroporación tuvo una eficiencia de 4.03 veces mayor para X-33/pPICZαA-LevB₁SaB que para X-33/pGAPZαA-LevB₁SaB.

5 clones X-33/pGAPZαA-LevB₁SaB y 5 clones X-33/pPICZαA-LevB₁SaB fueron seleccionados para evaluar la expresión de la enzima de fusión LevB₁SaB en cultivo por lote a lo largo de 120 h de fermentación.

Para el sistema de expresión inducible todas las clonas mostraron un incremento gradual de la actividad específica en el sobrenadante de cultivo a 120 h de fermentación en un rango 10-60 U/mg proteína, mientras que para el sistema constitutivo las clonas no mostraron

diferencias significativas en actividad, obteniendo valores de 21-25 U/mg proteína.

La clona 1 X-33/pPICZαA-LevB₁SaB para el sistema de expresión inducible mostro los niveles más altos de expresión de LevB₁SaB, mientras que para el sistema constitutivo al no haber diferencia significativas entre las clonas se decidió seleccionar una al azar.

En la **Fig. 2** se muestra la cinética de crecimiento y actividad para los dos sistemas de expresión, donde se observa que la enzima recombinante se produce 10 veces más en el sistema de expresión inducible que en el sistema constitutivo, bajo las condiciones probadas.

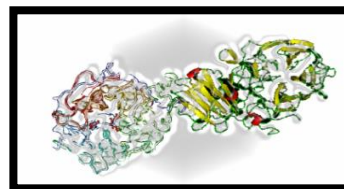


Fig. 1. Enzima de fusión

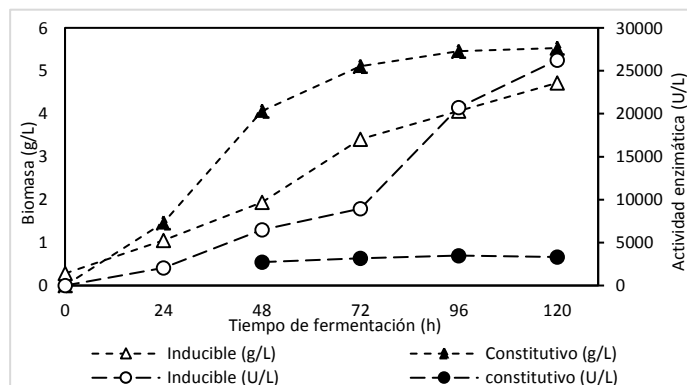


Fig. 2. Expresión de LevB₁SaB recombinante en el sistema de expresión *Pichia pastoris*,

Conclusiones. Se produjo la enzima recombinante LevB₁SaB por fermentación empleando el sistema de expresión *P. pastoris*. El sistema de expresión inducible presenta 10 veces mayor actividad enzimática en el sobrenadante de cultivo, bajo las condiciones probadas.

Agradecimientos. CONACYT

Bibliografía.

1. Porras-Domínguez JR et al (2017) *Carbohydr Polym.* 177:40-48.

