



## EVALUACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA SERÍN-PROTEASA EN *PICHIA PASTORIS*

Eneida J. Hernández-Vásquez, M. Magdalena Iracheta-Cárdenas, Eddy L. Cab-Barrera, José M. Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán. Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Av. Pedro de Alba s/n, Col. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México, 66450.  
(81) 83294000 ext. 6439, mguerrer@fcb.uanl.mx

Palabras clave: *Pichia pastoris*, tripsina, serín-proteasas, inmunodetección

**Introducción.** Las serín-proteasas presentan un gran interés desde el punto de vista fisiológico y en diversas aplicaciones de la actividad humana. Varios intentos han sido realizados con la finalidad de obtener sus formas recombinantes, sin embargo han sido pocos los casos de éxito debido a la toxicidad que estas enzimas causan al hospedero (1). Con el fin de producir tripsina recombinante de camarón, hemos construido cepas recombinantes de *Pichia pastoris* que contienen en su genoma el DNAC de la tripsina del camarón Blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), sin embargo con las estrategias experimentales empleadas, no se ha detectado el producto recombinante esperado a pesar de la presencia de sus transcritos.

En este trabajo, se evaluó una estrategia de cultivo y un sistema de inmunodetección con el fin de detectar la producción de la tripsina de *L. vannamei* en *P. pastoris*.

**Metodología.** Se empleó una cepa recombinante KM71 (Mut<sup>S</sup>) de *P. pastoris* portadora en su genoma el DNAC de la tripsina del camarón *Litopenaeus vannamei* fusionado a la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*. Como cepas control, se emplearon una cepa KM71 de *P. pastoris* productora de una proteína de 20 kDa y KM71-Tg productora de tripsinógeno de camarón. Cada cepa se reactivó en YPD a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 9-10. Con cada cultivo reactivado se inocularon 100 ó 600 mL de BMG (1.34% YNB, 100 mM de fosfato de potasio [pH 6], 4x10<sup>-5</sup>% biotina, 1% de glicerol) a una DO<sub>600</sub> inicial de 0.3 y se incubó a 30°C, 250 rpm por 12 h hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 8-12. Todas las células del cultivo en BMG se cosecharon y se cultivaron en 20 ó 100 mL de medio BMMA (1.34% YNB, 100 mM de fosfato de potasio [pH 6], 4x10<sup>-5</sup>% biotina, 0.8% L-alanina y 0.75% de metanol) a 30°C, 250 rpm por 48 y 72 h, y adición de metanol cada 12 h. El paquete celular se lisó por ultrasonido o tratamiento enzimático y se recuperaron las proteínas intracelulares solubles. El sobrenadante de cada cultivo fue desalado y concentrado 20-50 veces por ultrafiltración. Tanto el sobrenadante directo, como su preparación concentrada y las proteínas solubles intracelulares se analizaron por SDS-PAGE, dot blot y Western blot. De cada preparación, se determinó la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford. Para las técnicas de inmunodetección se

empleó como primer anticuerpo un IgG policlonal de conejo (Anti-Tr), producido por *Genscript Ca.* a partir de un péptido sintético de 15 residuos de tripsina del camarón Blanco del Pacífico conjugado con KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin). Además, se usó un anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo y NBT/BCIP como sustrato.

**Resultados y discusión.** La biomasa en BMMA al inicio de la inducción fue de 25-30 en DO<sub>600</sub> y de 50-60 a las 48 y 72 h de inducción, respectivamente, indicando un crecimiento celular durante esta etapa. Sin embargo, la concentración de proteínas totales extracelulares disminuyó en un 30% de 48 a 72 h de inducción. La inmunodetección por dot blot con Anti-Tr fue positiva para tripsina de *L. vannamei* en los sobrenadantes y muestras de proteínas solubles intracelulares a las 48 y 72 h de inducción. Mediante el análisis por Western blot de las proteínas solubles intracelulares y los sobrenadantes concentrados de las 48 y 72 h de inducción, se detectaron dos proteínas de 29-32 kDa y 16 kDa. Es probable que la proteína de 29-32 kDa corresponda a una forma glicosilada de la tripsina de camarón que tiene un peso molecular teórico de 25 kDa y la proteína de 16 kDa se relacione con productos de degradación de esta enzima. La adición de alanina al medio inductor, la cual actúa como fuente de carbono y amortiguador sin reprimir la expresión del gen heterólogo, aunado a las densidades celulares alcanzadas durante la inducción pudieran ser las causas que favorecieron la producción de la tripsina de *L. vannamei* en niveles detectables por inmunodetección.

### Conclusiones.

En el presente trabajo se han producido e identificado por primera vez dos formas de la tripsina recombinante del camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) empleando a *P. pastoris* como hospedero.

**Agradecimientos.** Agradecemos el apoyo por parte de CONACYT-SEP (CB-2005-01-25618), PAICYT (CN1109-05) y CONACYT-SNI-Estudiantes (105047), y el apoyo técnico brindado por el Q.B.P. José A. Fuentes-Garibay

### Bibliografía.

1. Hohenblum H, Vorauer-Uhl K, Katinger H, Mattanovich D. (2004). Bacterial expression and refolding of human trypsinogen. *J. Biotechnol.* 109: 3-11.