



INGENIERÍA DE PROTEÍNAS PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA FITASA TERMOESTABLE EN *PICHIA PASTORIS*

Juan Antonio Gallegos-López; Jesús Gerardo Carreón-Treviño, Arturo Rojo-Domínguez, Martha Guerrero-Olazarán, José María Viader-Salvadó. 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, jmviader@yahoo.com.mx

Palabras clave: fitasa termoestable, Pichia pastoris, Bacillus

Introducción. La mayor parte del fósforo inorgánico de origen vegetal se encuentra en forma de fitato, el cual no es digerido por los animales monogástricos, lo que les causa una deficiencia de fósforo, además de contaminación a nivel del suelo por fósforo en las heces. Una alternativa, es el empleo de fitasas como aditivo en la nutrición animal, las cuales catalizan la liberación de los grupos fosfatos del fitato. Sin embargo, las altas temperaturas empleadas en el procesado del alimento a nivel industrial desnaturalizan las enzimas adicionadas, perdiendo éstas su función catalítica.

En el presente trabajo, se diseñó una fitasa termoestable, se clonó y expresó su secuencia codificante en la levadura *Pichia pastoris*, y se caracterizaron sus propiedades fisicoquímicas.

Metodología. Para diseñar secuencias aminoacídicas de fitasas con actividad a pH 7.5 y alta probabilidad de ser termoestables, se empleó una combinación de dos metodologías: a) el uso del "consensus concept" para la ingeniería de la termoestabilidad de proteínas (1) a partir de 15 secuencias aminoacídicas de fitasas del género *Bacillus* tomadas del GenBank y b) un análisis de modelaje molecular por homología para determinar aminoácidos estabilizantes. A partir de una secuencia aminoacídica resultante, se diseñó y se construyó el gen sintético (*fte*), y por mutaciones sitio dirigidas se sintetizaron los genes *ftell* y *fba*. Los tres genes se clonaron en pPIC9 y se expresaron en *Pichia pastoris*. Las fitasas recombinantes producidas FTE, FTEII y FBA fueron parcialmente purificadas, se determinó su actividad enzimática a pH 7.5, el peso molecular en geles de SDS-PAGE, la secuencia del extremo N-terminal de las fitasas FTEII y FBA, y la glicosilación. Adicionalmente, se determinó el efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática de las tres fitasas, y la actividad residual a 80°C.

Resultados y discusión. La secuencia aminoacídica consenso presentó un 98% de similitud con la fitasa termoestable de *Bacillus amyloliquefaciens* (2), diferenciándose en sólo siete residuos, de los cuales, cuatro de ellos mostraron interacciones con el resto de la proteína que sugieren que podrían estabilizar a la proteína. Se obtuvieron cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del los genes *fte*, *ftell* y *fba*. Tanto la

fitasa FTE como la FTEII y la FBA mostraron actividad enzimática de fitasa a pH 7.5. La secuenciación del extremo N-terminal de las fitasas FTEII y FBA demostró su identidad y el correcto procesamiento del péptido señal. El análisis de desglicosilación demostró que las tres fitasas están N-glicosiladas y que el peso molecular experimental de las tres fitasas es de 39 kDa. El análisis del efecto del pH y la temperatura en la actividad catalítica indicó que el pH óptimo de las fitasas FTE, FTEII y FBA es 7.5 y que las temperaturas óptimas son de 45, 70 y 55°C, respectivamente. La actividad residual de la FTE a 80°C en presencia de 1 mM CaCl₂ y pH 7.5 resultó ser del 5%, pero aumentó a 30% en presencia de 5 mM de CaCl₂. La actividad residual de la FTEII bajo las mismas condiciones fue del 9 y 59%, respectivamente, y del 6 y 68% para la FBA. Estas actividades residuales evaluadas a pH 5.5 para la FTE fueron del 83 y 79%, respectivamente, 71 y 83% para la FTEII y 86 y 85% para la FBA.

Conclusiones. Las nuevas fitasas diseñadas (FTE y FTEII) y la fitasa FBA fueron producidas en *P. pastoris*, tienen actividad a pH 7.5 y una marcada termoestabilidad a pH 5. Además las fitasas FTEII y FBA mostraron ser más termoestables a pH 7.5 y 5 mM de CaCl₂ que la fitasa C de *Bacillus subtilis* nativa (3) y recombinante.

Agradecimientos. Agradecemos el apoyo por parte de CONACYT-SAGARPA (2003-02-141) y el apoyo técnico brindado por el Q.B.P. José Antonio Fuentes Garibay. JAGL y JGCT agradecen la beca del CONACYT.

Bibliografía.

1. Lehmann, M., Loch, C., Middendorf, A., Studer, R., Lassen, S.F., Pasamontes, L., van Loon, A. y Wyss, M. (2002). The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. *Protein. Eng.* 15(5): 403-411.
2. Kim, Y.O., Kim, H.K., Bae, K.S., Yu, J.H. y Oh, T.K. (1998). Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Technol.* 22(1): 2-7.
3. Kerovuo, J., Lappalainen, I. y Reinikainen, T. (2000). The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268(2): 365-369.