



EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA LACASA DE *CORIOLOPSIS GALLICA* EN *PICHIA PASTORIS*.

Mayra Guadalupe Avelar Frausto, Clarita Olvera Carranza, Marcela Ayala Aceves. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, C.P. 62210, avelar@ibt.unam.mx

Palabras clave: lacasa, expresión heteróloga, *Pichia pastoris*.

Introducción. El uso de enzimas como la lacasa que tiene la capacidad de oxidar contaminantes orgánicos es una opción prometedora para el campo de la biorremediación. Enzimas con alta actividad y estabilidad son deseables en este tipo de procesos. El estudio de estas propiedades, relacionadas con la estructura molecular y electrónica de las proteínas, es relevante para el diseño racional de lacasas con mejores propiedades catalíticas. Para la generación de estas enzimas modificadas se requiere de su expresión en un sistema heterólogo. La levadura *Pichia pastoris* ha sido utilizada con éxito en la expresión de lacasas fúngicas (1). Es un sistema con ventajas, tales como altos niveles de expresión, modificaciones post-traduccionales y eficiencia en la secreción de proteínas. El objetivo de este trabajo es llevar a cabo la expresión heteróloga de la lacasa de *Coriopsis gallica* en *P. pastoris*, estudiando los factores que la afectan.

Metodología. Se utilizó el vector pPICZB inducible por MeOH. El plásmido pPICZB/Lcg con el gen de la lacasa y el factor α de *Saccharomyces cerevisiae*, modificado por evolución dirigida (2), se transformó en la cepa X33 de *P. pastoris* por electroporación. Las transformantes se seleccionaron por resistencia a zeocina. Se eligieron las transformantes que expresaron el gen de la lacasa como describe Lu et al. (1). Se crecieron 4 transformantes en matraz y se eligió la de mayor actividad enzimática para realizar estudios del efecto de [MeOH] y [CuSO₄] en la expresión. Con las mejores condiciones encontradas en matraz, se llevaron a cabo ensayos en biorreactor, los medios utilizados son los que se describen en Hong et al. (3). Se usó un fermentador marca New Brunswick™ de 2 L, con un volumen de trabajo de 1.5 L. Los ensayos de actividad lacasa se realizaron a temperatura ambiente en amortiguador succinatos (pH=4.5, 60mM), con siringaldazina como sustrato (530 nm, $\epsilon=64,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Resultados. El plásmido pPICZB/Lcg fue transformado por electroporación en la cepa X33 de *P. pastoris*. Las colonias que expresaron el gen de la lacasa se seleccionaron por la presencia de coloración verde alrededor de las mismas. Los resultados del efecto de la concentración de CuSO₄ y MeOH se reportan en la Figura 1. La [CuSO₄] no mostró efecto en los niveles de expresión, mientras que [MeOH] sí mostró una influencia. Se realizaron pruebas con 0.25, 0.5, 1 y 1.5 % de MeOH. Para 0.25 y 0.5 % se estimó una actividad volumétrica menor a 0.001 U/mL. Por otro lado para 1% se alcanzó una actividad máxima de 0.07 U/mL en 12 días, mientras

que para 1.5 % la actividad máxima fue de 0.01 U/mL en 7 días.

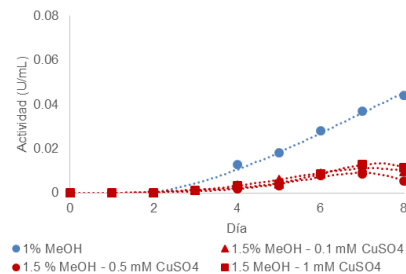


Fig. 1. Efecto de [MeOH] y [CuSO₄].

Posteriormente se realizaron pruebas en biorreactor con la mejor condición de MeOH encontrada (1 %) y 0.5 mM de [CuSO₄]. La cinética de crecimiento, así como de actividad volumétrica se muestra en la Figura 2. La actividad máxima correspondió a 0.3 U/mL.

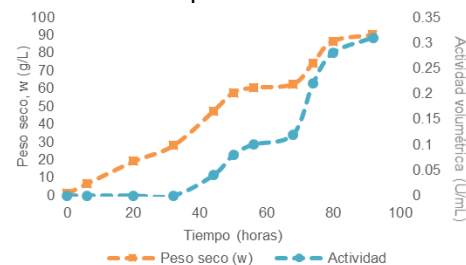


Fig. 2. Cinética de crecimiento y actividad volumétrica de la lacasa producida en fermentador.

Conclusiones. Se logró expresar heterológamente la lacasa de *C. gallica* en el sistema de *P. pastoris*. El factor que mostró mayor influencia en la expresión fue [MeOH]. Los niveles de actividad lacasa alcanzados en matraz fueron muy bajos (0.07 U/mL). En la producción en biorreactor se logró aumentar esta actividad aproximadamente tres veces (0.3 U/mL).

Agradecimiento. Los autores agradecen el apoyo 179241 y 219728 concedido por CONACyT.

Bibliografía.

- Lu L., Zhao M., Liang S.C., Zhao L.Y., Li D.B., Zhang, B.B. (2009). *J. Appl. Microbiol.* 107 (4): 1149-1156.
- Camarero S., Pardo I., Cañas A.I., Molina P., Record E., Martínez A.T., Martínez M.J., Alcalde M. (2012). *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (5): 1370-1384.
- Hong F., Meinander N.Q., Jönsson L.J. (2002). *Biotechnol. Bioeng.* 79 (4): 438-449.