

CONSTRUCCIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES DE *Pichia pastoris* PRODUCTORAS DE UNA FITASA BACTERIANA

Lilí Rodríguez-Blanco, Eddy L. Cab-Barrera, José M. Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán.
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, San Nicolás de los Garza, N.L., México, 66450.
Fax: (81) 83-294110 Ext. 6415, e-mail: mguerrer@fcb.uanl.mx

Palabras clave: *Pichia pastoris*, fitasa, proteínas recombinantes

Introducción. Actualmente no existe en el mercado una fitasa ideal de aplicación universal, ya que ésta debe ser efectiva en diferentes especies animales, estable al almacenamiento y al tratamiento del calor durante el procesamiento de los alimentos y competitiva en costos de producción (1). Muchas especies de gran importancia económica como lo es el caso del camarón, aún no se han favorecido con el empleo de fitasas en su nutrición debido a características metabólicas y de cultivo que presenta esta especie.

Con el fin de contar con una fitasa que reúna las características específicas para su aplicación en la nutrición del camarón en nuestro grupo de trabajo se ha seleccionado una fitasa para esta aplicación específica y en este trabajo se describe la construcción de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* capaces de producir y secretar esta fitasa de origen bacteriano

Metodología. De acuerdo a las propiedades bioquímicas documentadas en la literatura se seleccionó la fitasa codificada por el gen *phyC* de *Bacillus subtilis* (2). El gen *phyC* fue aislado por PCR a partir de preparaciones de DNA de la cepa cultivada y con éste se construyó un vector de expresión del sistema de *P. pastoris* portando el gen *phyC* de *B. subtilis*. Con el vector previamente caracterizado se transformó la cepa GS115 de *P. pastoris* por la técnica de formación de esferoplastos. La integración del gen heterólogo en las recombinantes obtenidas fue determinada mediante análisis por PCR del genoma aislado de estas cepas. La expresión del gen *phyC* de *B. subtilis* fue evaluada mediante el análisis de las proteínas en el medio de cultivo de las cepas recombinantes cultivadas bajo condiciones de inducción.

Resultados y discusión. El producto de PCR amplificado a partir del de DNA genómico de la cepa VTT E-68013 de *B. subtilis* con la DNA polimerasa Isis (Qbiogene) fue clonado en el vector pCR 2.1 TOPO (*Invitrogen*). El gen de interés se liberó del vector TOPO a través de una doble digestión y se subclonó en el vector de integración pPIC9 de *P. pastoris* (*Invitrogen*) para obtener el vector pPIC9*phyC* de 9,064 pb. El vector pPIC9*phyC* contiene la secuencia que codifica para la proteína madura de la fitasa C de la cepa de *B. subtilis*, la cual se encuentra en marco de lectura con la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y el promotor *AOX I* para conducir a su expresión y secreción hacia el medio de cultivo. Las cepas de GS115 transformadas con el vector pPIC9*phyC* integraron en su genoma el cassette de

expresión, evidenciado por el análisis por PCR realizado a preparaciones de DNA de las cepas recombinantes. En el análisis por electroforesis en gel de agarosa mostrado en la Fig. 1 se observa la banda de 1,534 pb correspondiente al gen de *phyC* amplificado y la banda de 2105 pb correspondiente al gen *AOX I*.

Los análisis por SDS-PAGE de la expresión de las cepas recombinantes inducidas durante 24 h indicaron la presencia de una banda de ≈ 45 kDa correspondiente a la fitasa C de *B. subtilis*.

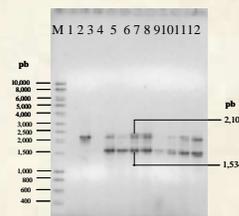


Fig. 1. Análisis de integración del gen *-phyC* en el genoma del *P. pastoris*. Gel de agarosa al 0.8% de los productos amplificados por PCR. M: Marcador de peso molecular (*Hyper ladder I*, Carril 1: control negativo. Carril 2: DNA genómico de GS115. Carril 4-12: DNA genómico de clones GS115-*phyC*.

Conclusiones. Los resultados evidencian la construcción de una nueva cepa de *P. pastoris* portadora del gen *phyC* de *B. subtilis* y capaz de producir y secretar una fitasa bacteriana. Esta enzima recombinante podrá ser caracterizada y empleada para realizar estudios posteriores sobre su potencial aplicación en la nutrición acuícola.

Agradecimientos. Agradecemos los apoyos económicos otorgado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la UANL (PAICyT) y al Fondo Sectorial de Investigación SAGARPA-CONACYT 2-2003-03 (No. 2003-02-141) y a las estudiantes M. Espinosa Juárez y B. Mercedes Bautista por el apoyo técnico brindado. LRB agradece la beca otorgada por PROMEP-UJAT.

Bibliografía.

1. Lei, XG, Stahl, CH. (2000). Nutritional benefits of phytase and dietary determinants of its efficacy. *J. Appl. Anim. Res* 17: 97-112.
2. Kerovuoto, J, Lauraeus, M, Nurminen, P, Kalkkinen, N, Apajalahti J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(6): 2079-2085.