



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



EMPLEO DE UNA CEPA DEFICIENTE EN PROTEASAS A DE *PICHIA PASTORIS* PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA LIPASA RECOMBINANTE SENSIBLE A LA PROTEÓLISIS

Jorge A. Rodríguez^{1,2}, Ahmed Aloulou², Lilia D. Mendoza², Alain de Caro^{2†}, Frédéric Carrière²

¹CIATEJ A.C., Unidad de Biotecnología Industrial, Guadalajara, Jal., México C.P. 44270. Correo: jargda@yahoo.com

²EIPL, UPR 9025 CNRS, Chemin Aiguier, 13402, Marsella, Francia, <http://eipl.cnrs-mrs.fr/>

[†]Dedicado a la memoria de nuestro colega y amigo Alain de Caro fallecido el 20 de julio del 2009.

Palabras clave: *Pichia pastoris*, lipasas, proteólisis.

Introducción. Uno de los problemas para la correcta caracterización bioquímica de las enzimas nativas y recombinantes es la proteólisis, donde en ocasiones los inhibidores de proteasas inhiben también a la enzima de interés. Para resolver este problema al producir enzimas recombinantes, se han diseñado cepas con deficiencia en proteasas, como la cepa SMD1168H de *Pichia pastoris* [1] deficiente en proteasas tipo A. Enzimas como la lipasa pancreática humana relacionada del tipo 2 (HPLRP2), cuya actividad preferencial se ha reportado para los galactolípidos [2], son muy sensibles a la acción de las proteasas presentes en el medio de cultivo, lo cual dificulta su estudio bioquímico debido a su inestabilidad al momento de ser purificada y caracterizada.

El objetivo del presente trabajo fue transformar la cepa SMD1168H de *Pichia pastoris* para la producción de la rHPLRP2 con la menor degradación proteolítica posible para su caracterización bioquímica.

Metodología. El ADNc de la HPLRP2 clonado en el plásmido pGAPZB [2] fue utilizado para clonación en las levaduras de *P. pastoris* (invitrogen) X-33 (cepa silvestre) y SMD1168A (cepa -PA) por electroporación. Los clones positivos fueron seleccionados y crecidos por 3 días en un medio YPD con aitiótico. La actividad enzimática se midió con tributirina (TC4) a pH 8.0 y 37°C [2]. Los clones con mayor actividad fueron seleccionados para cinéticas de producción en YPD por 7 días. Se realizó Western blot cargando la misma cantidad de unidades totales de rHPLRP2 con anticuerpos policlonales para la HPLRP2 e inmunoglobulinas de cabra anticonejo conjugadas a la fosfatasa alcalina.

Resultados y discusión. En la Fig. 1A, se muestra la actividad de los clones positivos para los dos tipos de cepas de *P. pastoris*. En las cinéticas de producción de la rHPLRP2 para cada cepa (Fig. 1B), se observó una mayor producción para la cepa SMD1168H (31 U/mL) respecto a la X-33 (22 U/mL) a los 7 días de cultivo, debido a que existe una mucho menor proteólisis de la rHPLRP2 con la cepa - PA (Fig. 1C). Se recomienda para el cultivo de la rHPLRP2 a los 2 días para SMD1168H, ya que su producción es mayor (24 U/mL) y la enzima se encuentra con una baja proteólisis en

comparación con X-33 (16 U/mL).

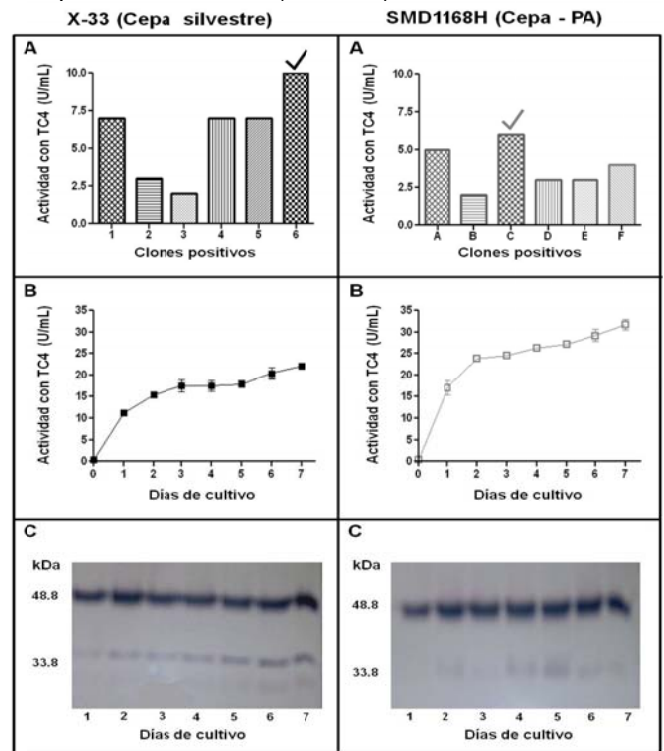


Fig. 1. Producción de la HPLRP en la cepa X-33 y SMD1168H de *Pichia pastoris*. (A) Actividad en tributirina (TC4) de los clones positivos. (B) Cinéticas de cultivo de los mejores clones obtenidos para la rHPLRP2 de cada cepa. Análisis por Western blot de las cinéticas de producción de la rHPLRP2.

Conclusiones. El empleo de la cepa deficiente en proteasas (SMD1168H) de *P. pastoris* permitió producir una rHPLRP2 con una menor degradación lo cual permitió su posterior purificación y caracterización bioquímica.

Agradecimiento. Jorge A. Rodríguez agradece al CONACYT por su beca de doctorado.

Bibliografía.

- Cregg J.M. y Russell K.A. (1998). *Methods Mol Biol.* Vol (103): 27-39.
- Sias, B., Ferrato F., Grandval P., Lafont D., Boullanger P., de Caro A., Leboeuf B., Verger R. y Carriere F. (2004). *Biochemistry.* Vol 43 (31): 10138-10148.