

# EVALUACIÓN DE DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE LA BIOSÍNTESIS HETERÓLOGA DE TRIPSINA Y TRIPSINÓGENO DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) EN *Pichia pastoris*

Luis Lauro Escamilla-Treviño, José María Viader-Salvadó, Luis Galán-Wong, Martha Guerrero-Olazarán. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina y Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Madero y Dr. Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, 64460 Monterrey N.L. (México)  
Fax: 8329-4000 Ext. 2587, correo electrónico: [mguerrer@ccr.dsi.uanl.mx](mailto:mguerrer@ccr.dsi.uanl.mx)

Palabras claves: *tripsina*, *Pichia pastoris*, *Litopenaeus vannamei*.

## Introducción

Con el sistema de expresión que emplea como hospedero a *Pichia pastoris* se han producido con altos rendimientos una gran variedad de proteínas, tanto para fines de investigación como para fines comerciales (1). La importancia de la tripsina en muchos procesos biológicos y aplicaciones industriales han hecho de esta enzima objeto de intenso estudio (2).

Anteriormente en nuestro laboratorio fueron construidas cepas recombinantes de *Pichia pastoris* portadoras de los ADNc's de tripsina y tripsinógeno de camarón (*Litopenaeus vannamei*). Bajo condiciones estándares de cultivo de estas cepas recombinantes no fue posible detectar tripsina ni tripsinógeno. Debido a estos resultados, en el presente trabajo se evaluaron diferentes condiciones de cultivo con el objetivo de favorecer la biosíntesis de los productos recombinantes.

## Metodología

Se emplearon las siguientes cepas recombinantes de *Pichia pastoris*: GS115-Tr (portadora del ADNc de tripsina), GS115-Tg (portadora del ADNc de tripsinógeno) y las cepas control GS115-vector (transformada con el vector sin inserto) y GS115-22K (portadora de un ADNc heterólogo).

Se evaluaron diferentes densidades celulares iniciales (DO<sub>600</sub> 1.4, 15 y 60) y diferentes medios de cultivo durante la fase de inducción: BMM (medio mínimo amortiguado con metanol), BMMY (BMM suplementado con peptona y extracto de levadura) y BMM suplementado con sobitol. Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraz agitado y se tomaron muestras a diferentes tiempos. Se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y ensayos de Western blot de medios de cultivo libres de células y fracciones solubles de lisados celulares.

## Resultados y Discusión

En la SDS-PAGE de medios de cultivo se observó que la cepa GS115-Tr cultivada en medio BMM suplementado con sorbitol a una DO<sub>600</sub> inicial de 60 presentó una banda de un tamaño aproximado a 33 kDa (tamaño similar al de la tripsina de camarón purificada de fuente natural 31 kDa), que no se observó en los otros medios de cultivo, ni en las cepas control. Sin embargo, la inmunodetección por Western blot resultó negativa. En la cepa GS115-Tg se pudo detectar el tripsinógeno por Western blot al cultivarse en el medio BMM suplementado con sorbitol, no así en los otros medios. La cepa GS115-22K produjo abundantemente la proteína de

heteróloga en los diferentes medios de cultivo evaluados, lo que indica que no existe una represión del promotor en los medios BMM suplementados. La cepa GS115-vector no mostró patrones electroforéticos significativamente diferentes en los medios empleados. Se cree que la banda de 33 kDa que se obtuvo en la cepa GS115-Tr pudiese tratarse de tripsina, sin embargo un patrón de glicosilación diferente al de la tripsina natural pudo haber influido en el reconocimiento de los anticuerpos empleados en los ensayos de Western blot.

## Conclusiones

El medio de cultivo BMM suplementado con sorbitol y el empleo de altas densidades celulares fueron útiles para la detección de tripsinógeno de camarón y probable tripsina. Se piensa que la actividad proteolítica de estas proteínas pudo afectar a enzimas responsables del metabolismo del metanol, como la alcohol oxidasa, imposibilitando la obtención de energía a través del metanol y de esta manera impidiendo llevar a cabo la biosíntesis a niveles detectables. Por lo tanto al agregar sorbitol como fuente de carbono y energía adicional se pudo detectar el tripsinógeno y una posible tripsina.

## Agradecimientos

Agradecemos los apoyos económicos del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT, No. CN343-00) de la UANL, así como a los estudiantes de servicio social por el apoyo técnico brindado. LLET agradece al CONACYT por la beca otorgada.

## Bibliografía

1. Romanos, M.A. (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression. *Curr. Opin. Biotech.* 6: 527-533.
2. Klein, B., Le, G., Moullac, D., Sellos, A., Van-Wormhoudt, A. (1996). Molecular Cloning and Sequencing of Trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in Assessing Gene Expression during the Moulting Cycle. *J. Biochem. Cell Biol.* 28(5): 551-563.
3. Sreerishna, K., Brankamp, R.G., Kroop, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A., Birkenberger, L.A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190: 55-62.