

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UNA ESTERASA DE *CARICA PAPAYA* EN *KOMAGATAELLA PHAFFII*

David A. Torres Añorve¹, Ana Laura Reyes Reyes^{1, 2}, Francisco Valero Barranco³ y Georgina Sandoval¹. ¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Sede Guadalajara. 44270. Guadalajara, Jal., México. ² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 30870, Tuxtla Chico, Chiapas, México. ³ Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental. 08193. Bellaterra, Barcelona, España. Email: datorres_al@ciatej.edu.mx; gsandoval@ciatej.mx; reyes.ana@inifap.gob.mx

Palabras clave: Esterasa, proteína, papaya

Introducción. Las lipasas son enzimas ubicuas presentes en microorganismos, animales y plantas (1, 2). Son capaces de catalizar reacciones de hidrólisis, síntesis, transesterificación e interesterificación. Se caracterizan por su alta especificidad, robustez y generación de productos con alta pureza y calidad. Debido a que las enzimas más estudiadas son de origen microbiano, la búsqueda a partir de otras fuentes, así como proveer su disponibilidad son temas de interés en la actualidad (3).

El objetivo de este trabajo fue expresar funcionalmente en una levadura una esterasa de papaya (CpEST) bajo un sistema inducible con metanol (*pAOX1*).

Metodología. La secuencia codificante de CpEST se clonó en el vector pPICAZaB que contenía una Señal secretora N-terminal y se transformó en células electrocompetentes *K. phaffii*. Se usó Zeocina (100 mg/mL) como marcador de selección y tributirina al 1%. El constructo fue confirmado por PCR de colonias y secuenciación. La producción de enzimas se realizó con la adición de metanol al 0.5 % cada 24 h durante cuatro días. El sobrenadante obtenido fue empleado para determinar la actividad enzimática en pNPB (5). La presencia de la enzima en el sobrenadante fue verificada por SDS-PAGE.

Resultados. Se identificaron 11 colonias que formaron halo de hidrólisis en medio de placa de agar suplementado con tributirina (Fig. 1a).

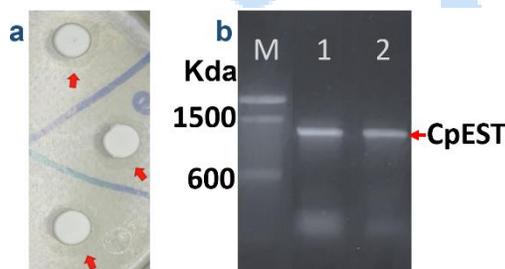


Fig. 1. Selección e identificación de clonas positivas que expresan el gen de CpEST. a) Formación de hidrólisis en medio

suplementado con tributirina 1 %. b) Producto de pcr de colonia. M: marcador 100pb; 1 y 2: amplicón de 1237pb (CpEST).

Un amplicón de aproximadamente 1237 pb, demostró la presencia del gen CpEST integrado dentro del genoma de la levadura seleccionada (Fig. 1b), cuya construcción de plásmido y enzima se transformó con éxito. La actividad enzimática máxima determinada fue de aproximadamente 43 U/mL (Fig. 2a).

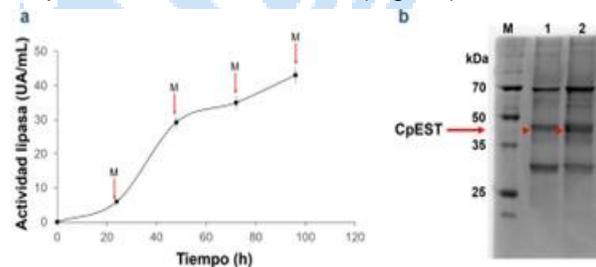


Fig. 2. Producción heteróloga de la enzima CpEST. a) Determinación de actividad lipasa en pNPB. b) SDS-PAGE de sobrenadante. M: marcador molecular; líneas 1 y 2: sobrenadante. Las flechas rojas señalan a la enzima recombinante.

El peso molecular teórico estimado para CpEST fue de 38 KDa aproximadamente (Fig. 2c). Sin embargo, estudios previos reportaron una diferencia de 3 KDa entre lo obtenido por predicción molecular y lo observado en SDS-PAGE (4). Esto se observó en el presente trabajo y probablemente se debe a que la proteína estaba glicosilada.

Conclusiones. Se logró la expresión funcional de la esterasa de *C. papaya* mediante una levadura.

Agradecimiento. Al LIBBA-BI-CIATEJ, CONACYT e INIFAP por apoyo con infraestructura y financiamiento del presente estudio.

Bibliografía.

- Rivera I, Mateos J, Sandoval G. 2012. Editor: Sandoval G. Editorial: Humana Press. New York, pp 115-122.
- Reyes A, Valero F, Sandoval G. 2022. *Catalysts*;12(9):960.
- Elemosho R, Suwanto A, Thenawidjaja M. 2021. *Electron J Biotechnol*; 53:71-9.
- Abdelkafi S, Ogata H, Barouh N. 2009. biochemical. *Biochim Biophys Acta*.1791(11):1048-56.
- Reyes A, Valero F, Sandoval G. 2023. *Electronic Journal of Biotechnology*. 61, 61-68.