XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
León, Guanajuato 23 al 28 de junio 2019
Resumen de Trabajos Libres

CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *Pichia pastoris* PRODUCTORAS DE UNA TANASA MONOMÉRICA DE *Aspergillus niger*

Daniela Ordaz-Pérez, Martha Guerrero-Olazarán, José María Viader-Salvadó
Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología, San Nicolás de los Garza, N.L., México C.P. 66455. jose.viadersl@uanl.edu.mx

Palabras clave: Pichia pastoris, tanasas, proteasa Kex2.

Introducción. Las tanasas (E.C. 3.1.1.20) son hidrolasas que catalizan la ruptura de enlaces éster de taninos, formándose principalmente ácido gálico y glucosa. Las tanasas tienen potencial aplicación en procesos industriales de alimentos (1). La tercera tanasa de mayor actividad específica reportada en la base de datos BRENDA es la tanasa de *Aspergillus niger* GH1 (1). Nuestro grupo de trabajo produjo en *Pichia pastoris* dicha tanasa; sin embargo, la actividad específica del extracto semipurificado fue menor que el reportado para la tanasa nativa (2). Además, un análisis de electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) mostró que la tanasa recombinante estaba formada por dos subunidades unidas por puentes disulfuro generadas por la proteasa Kex2 de *P. pastoris*, mientras que la tanasa nativa es una proteína monomérica estabilizada por puentes disulfuro.
Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue construir cepas de *P. pastoris* productoras de una tanasa monomérica de *A. niger* mediante la modificación de uno de los sitios de reconocimiento de la proteasa Kex2.

Metodología. A partir del gen sintético *ANTgs* que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1, se modificó un codon de un sitio de reconocimiento de la proteasa Kex2, mediante la técnica de extensión por PCR de superposición de ADN. El fragmento modificado (*TanM)* se utilizó para construir el plásmido pGEMTanM; el cual fue caracterizado por PCR y secuenciación. El fragmento *TanM se* subclonó en el vector pPIC9 usando los sitios *Xho* I y *Not* I, generando el plásmido pPIC9TanM que se caracterizó por PCR. Se construyeron cepas de *P. pastoris* KM71 por electroporación con el plásmido pPIC9TanM previamente digerido con *Sal* I. Las clonas transformadas se seleccionaron mediante auxotrofia a histidina y por PCR. Se diferenció entre las cepas con el fragmento *ANTgs* (KM71ANT) y las cepas con el fragmento *TanM* (KM71TanM) mediante PCR con oligonucleótidos específicos para cada cepa. Se realizaron cultivos de ambas cepas a 30°C en 100 mL de medio mínimo amortiguado adicionado con glicerol (BMG) para generar biomasa y posterior inducción a 30°C del gen heterólogo en 20 mL de medio mínimo amortiguado adicionado con metanol (BMM) por 72 h. Al sobrenadante se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford y la actividad enzimática de tanasa empleando metilgalato como sustrato. Además, se evaluó la posible N-glicosilación mediante el cambio de la migración en un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida al tratar las proteínas extracelulares con la endoglicosilasa endo H.

Resultados. En el ensayo de mutagénesis se obtuvo el fragmento *TanM* de 1,712 pb. Tres de los plásmidos pGEMTanM obtenidos amplificaron el fragmento esperado de 1,712 pb, confirmando la presencia del inserto correcto. Además, la secuenciación confirmó la modificación en el sitio de reconocimiento de Kex2. Los plásmidos obtenidos a partir de 4 colonias seleccionadas al azar amplificaron por PCR una banda de 1,200 pb, confirmando la correcta construcción del plásmido pPIC9TanM. La transformación de células de *P. pastoris* generó 84 clonas. Dos colonias seleccionadas al azar amplificaron por PCR un fragmento de 1,378 pb que confirmó la integración del cassette de expresión en el genoma de la levadura. El crecimiento celular a las 72 h de inducción del gen heterólogo, la concentración de proteínas extracelulares y la actividad volumétrica para la cepa KM71ANT fue mayor (DO_{600} 38.3, 84.6 µg/mL, 0.061 U/mL) que los valores obtenidos para la cepa KM71TanM (DO_{600} 35.8, 29.5 µg/mL, 0.057 U/mL). Por otro lado, la actividad específica en el sobrenadante fue mayor de la cepa KM71TanM (1.9 U/mg proteína) que en el de la cepa KM71ANT (0.7 U/mg proteína). El análisis de SDS-PAGE y la N-desglicosilación mostró que ambas tanasas son proteínas N-glicosiladas. Después del tratamiento de N-desglicosilación se observó que la proteína producida por la cepa KM71TanM es una proteína monomérica con peso molecular aparente de 65 kDa; mientras que la de KM71ANT produce la proteína como dos subunidades de 34.6 y 30.3 kDa (2).

Conclusiones. Se obtuvo una cepa de *P. pastoris* que produce una tanasa recombinante N-glicosilada de una única subunidad.

Agradecimientos. D.O.-P. agradece el apoyo del CONACYT por la beca otorgada.

Bibliografía

1. Renovato J *et al.* (2011) *Appl. Biochem. Biotechnol*. 165:382-395.
2. Fuentes-Garibay JA *et al.* (2015) *Mol. Biotech.* 57:439-447.