

CONSTRUCCIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES DE *Pichia pastoris* PRODUCTORAS DE LA β -GLUCOSIDASA DE LA TERMITA *Coptotermes formosanus*

David Alejandro Gutiérrez-Gutiérrez, José María Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán
Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología
San Nicolás de los Garza, N.L., México. C.P. 66455. martha.guerreroool@uanl.edu.mx

Palabras clave: *Pichia pastoris*, β -glucosidasa, *Coptotermes formosanus*

Introducción. Las β -glucosidasas son enzimas hidrolíticas que catalizan el corte de enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ de oligosacáridos de glucosa y contribuyen así a la degradación de la celulosa (1). Estas enzimas se utilizan en la industria de alimentos y bebidas, y en la generación de etanol a partir de celulosa, entre otras aplicaciones. Una de sus principales limitaciones para su uso industrial es la inhibición por producto, por lo que actualmente se busca encontrar β -glucosidasas resistentes a la inhibición por glucosa (2). La β -glucosidasa de la termita *Coptotermes formosanus* es una enzima con alta actividad específica (463 U/mg) y resistente a la inhibición por glucosa que puede ser atractiva industrialmente. Su producción en *Escherichia coli* (3) como cuerpos de inclusión dificulta su purificación, lo cual puede ser solventado utilizando hospederos alternativos como la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

El objetivo de este trabajo fue construir cepas de *P. pastoris* capaces de producir la β -glucosidasa de *C. formosanus*.

Metodología. La secuencia codificante de la β -glucosidasa de *C. formosanus* se sintetizó, clonó en el vector pUC57, y subclonó por PCR en el vector pGEM-T, agregando sitios de restricción *XhoI* y *NotI*. El plásmido resultante pGEM-BGlu se propagó en *E. coli* JM109. Los plásmidos de siete colonias transformadas seleccionadas al azar se caracterizaron por PCR, por digestión con *SaI*, y dos de ellos por secuenciación. La secuencia codificante de la β -glucosidasa se subclonó nuevamente en el vector pPIC9 utilizando los sitios *XhoI* y *NotI* para construir el plásmido pPIC9BGlu, el cual se caracterizó por PCR y digestión con *XhoI-NotI*. El plásmido linealizado con *SaI*, se empleó para transformar células de *P. pastoris* KM71 por electroporación. Las clonas transformadas se seleccionaron por prototrofia a histidina y se verificó la inserción del casete de expresión mediante PCR. Se realizaron cultivos de dos clonas transformadas (KM71BGlu) a 30°C y 250 rpm en medio mínimo amortiguado adicionado con glicerol (BMG) para generar biomasa y posterior inducción a 30°C del gen heterólogo en medio mínimo amortiguado adicionado con metanol (BMM) por 48 h, y adicionando metanol cada 12 h a una concentración final del 0.75% (v/v). Del medio libre de células de 24 y 48 h de inducción del gen heterólogo, se

determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford y actividad enzimática de β -glucosidasa a 40°C y pH 6.0 empleando celobiosa 1% como sustrato. Además, se evaluó la posible N-glicosilación de la enzima recombinante mediante análisis por SDS-PAGE de un concentrado proteico tratado con la glicosilasa endo H.

Resultados. Todos los plásmidos pGEM-BGlu analizados mostraron una única banda 1,463 pb por PCR, y otra de 4,432 pb al linealizar con *SaI*, lo cual confirmó su correcta construcción. Además, la secuenciación ratificó que al menos un plásmido presentó la secuencia deseada. Todos los plásmidos pPIC9BGlu analizados mostraron una única banda 1,722 pb por PCR, y fragmentos esperados de 7,980 pb y 1,450 pb al digerir con las enzimas *XhoI-NotI*, confirmando así la correcta construcción de pPIC9BGlu. Tres colonias transformadas de *P. pastoris* seleccionadas al azar amplificaron un fragmento de 1,722 pb que confirmó la integración del casete de expresión en el genoma de la levadura. Los sobrenadantes de los cultivos realizados (clona 2 y clona 3) presentaron una concentración de proteínas de 16.19 y 19.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h de cultivo y 29.21 y 31.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 48 h, respectivamente. Por su parte, la actividad volumétrica de β -glucosidasa fue de 1.84 y 1.99 U/mL a las 24 h y de 2.55 y 2.94 U/mL a las 48 h de cultivo, mientras que la actividad específica alcanzó 113.61 y 100.28 U/mg de proteína a las 24 h y 87.41 y 92.25 U/mg de proteína a las 48 h de cultivo. El análisis de SDS-PAGE mostró que ambas clonas producen una proteína con distintos grados de N-glicosilación, predominando masas moleculares aparentes de 53.2 y 56.5 kDa, y que la masa molecular aparente de la proteína N-desglicosilada es de 53.2 kDa, lo cual coincide con la masa molecular teórica de la β -glucosidasa de *C. formosanus* (3).

Conclusiones. Se construyeron cepas recombinantes de *P. pastoris* que producen de forma extracelular la β -glucosidasa activa de *C. formosanus*.

Agradecimientos. DAGG agradece el apoyo del CONACYT por la beca otorgada.

Bibliografía

1. Karnaouri A, et al. (2013) *PeerJ*. 1:e46.
2. Uchiyama T, Yaoi K, Miyazaki K (2015) *Front. Microbiol.* 6:548.
3. Zhang D, Allen AB, Lax AR (2012) *J. Insect Physiol.* 58(1):205-210.

