

Producción de Proteínas Recombinantes Dulces y Modificadoras del Sabor en *Escherichia coli*

Jessica J. Gómez-Lugo^a, Xristo Zárate Kalfópulos^{a*}

^a Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Químicas, Pedro de Alba s/n, San Nicolás de los Garza, México.

* xristo.zaratekl@uanl.edu.mx.

Palabras clave: Brazzein, Miraculin, Proteína de fusión, Enlaces disulfuro, *E. coli*.

Introducción

En la naturaleza existen proteínas con actividad dulce y modificadora del sabor; un ejemplo son Brazzein y Miraculin. Estas proteínas han demostrado poseer una actividad de 500–200 veces y de 3000 veces más dulce que la sacarosa la cual les brinda potencial para ser utilizadas como sustitutos de azúcar con poco aporte calórico y por lo tanto pueden ser utilizadas en alimentos, bebidas y medicinas¹. Una de las principales características estructurales que poseen es la presencia de enlaces disulfuro, los cuales aseguran su actividad además de brindarles estabilidad². En bacterias, la formación de estos enlaces se lleva a cabo en el periplasma, ya que es un compartimiento oxidante que almacena las enzimas encargadas de la formación del enlace disulfuro y de su isomerización así como chaperonas y enzimas de plegamiento³. Por otra parte, el citoplasma bacteriano al ser un compartimiento reductor no posee las enzimas necesarias para la formación de este tipo de enlaces⁴. Para eludir este problema una variedad de cepas modificadas han sido producidas, las cuales tienen una interrupción total o parcial de una o ambas vías implicadas en asegurar que el citoplasma sea un ambiente reductor⁴ y además cuentan con la disulfuro isomerasa DsbC que se encarga del correcto plegamiento de los enlaces disulfuro⁵. El objetivo de este proyecto es utilizar a la bacteria *E. coli* como una fábrica celular microbiana para la expresión en el citoplasma de proteínas complejas con múltiples enlaces disulfuro mediante el uso de proteínas de fusión como CusF3H+ la cual permitirá la mejora en el proceso de purificación aumentando la pureza de la proteína obtenida⁶. Además, el desarrollo de nuevas tecnologías de expresión y purificación de proteínas dulces y modificadoras del sabor permitirá la obtención de nuevos productos que pueden ser utilizados en la industria alimenticia y farmacéutica.

Parte experimental

La metodología comienza por la síntesis del gen de interés y su posterior clonación en *E. coli* DH5 α utilizando el plásmido pET30a_CusF3H+. Una vez completa la clonación, la construcción se transforma en la cepa de expresión *E. coli* SHuffle T7 express. La expresión de la proteína de interés se verifica por SDS-PAGE. Para la purificación se utiliza IMAC e Intercambio Aniónico y una vez que se remueve la proteína de fusión de la proteína de interés se evalúa la actividad de las proteínas.

Resultados y discusión

Para la microexpresión de CusF3H+_Miraculin y CusF3H+_Brazzein se tomaron en cuenta las condiciones probadas por Vargas-Cortez (2017), además los resultados muestran que el uso CusF3H+ como proteína de fusión permite la obtención de proteína altamente soluble (Figura 1) y facilita la etapa de purificación (Figura 2) al utilizar IMAC Ni(II).

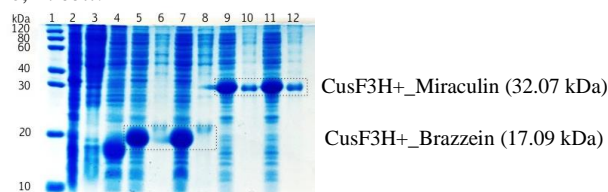


Figura 1. Microexpresión de CusF3H+_Brazzein (17.09kDa) y CusF3H+_Miraculin (32.07kDa) mediante SDS-PAGE al 15%.

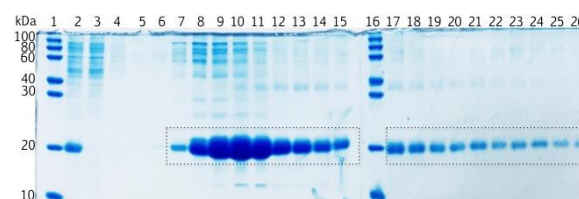


Figura 2. Purificación por IMAC Ni(II) y análisis de fracciones de elución de CusF3H+_Brazzein (17.09kDa) mediante SDS-PAGE 15%.

Debido a que se pretende que la proteína Brazzein sea una alternativa de edulcorante natural para los humanos, la inocuidad de la proteína es necesaria. Tomando en cuenta lo anterior se llevó a cabo una cromatografía de intercambio aniónico para la remoción de endotoxinas. CusF3H+_Brazzein al tener una carga negativa compite con las endotoxinas por los sitios de unión, los cuales eventualmente se saturan. Aquellas proteínas que no interaccionan con la resina, capturan a las endotoxinas y por lo tanto eluyen de la columna, permitiendo la obtención de proteína libre de endotoxinas⁷.

Conclusiones

Se obtuvo la correcta expresión en *E. coli* de las proteínas CusF3H+_Brazzein y CusF3H+_Miraculin, puesto que se observa la aparición de nuevas bandas que corresponden al peso molecular deseado. Se logró la purificación de la proteína CusF3H+_Brazzein mediante cromatografía por afinidad a Ni(II). 50mM TRIS, 500 mM NaCl, 5mM Imidazol como solución amortiguadora de lisis, 50mM TRIS, 500 mM NaCl, 10mM Imidazol como solución amortiguadora de lavado y 50mM TRIS, 500 mM NaCl, 200mM Imidazol como solución amortiguadora de elución. Finalmente se purificó la proteína CusF3H+_Brazzein mediante cromatografía de intercambio aniónico, permitiendo la obtención de proteína altamente pura.

Referencias

1. Jo, H. J. *Protein Expr. Purif.* **2013**, 90, 84-89
2. Sato, Y. & Inaba, K. *FEBS J.* **2012**, 279, 2262-2271.
3. de Marco, A. *Microb. Cell Fact.* **2009**, 8, 26-44.
4. Hatahet, F., Ruddock, L. W. *Microb. Cell Fact.* **2010**, 9, 67-76
5. Lobstein, J. et al. *Microb. Cell Fact.* **2012**, 11, 56-72
6. Vargas-Cortez T. & Zarate, X. *Protein Expr. Purif.* **2017**, 132, 44-49
7. Ongkudon, C. M. *ISRN Chromatogr.* **2012**, 1-9