

Producción extracelular de glucosa oxidasa recombinante por *Pichia pastoris*

Evelyn Martínez Mora^{1*}, María del Rosario González González¹, Xristo Zárate Kalfópulos¹, Isaías Balderas Rentería¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Guerrero s/n, Treviño, C.P. 64570 Monterrey, Nuevo León México.

*evelyn_mtzm@hotmail.com

Palabras clave: glucosa oxidasa, *Pichia pastoris*, electroporación

Introducción

La glucosa oxidasa (GOx) es una enzima que en presencia de glucosa y oxígeno forma H₂O₂ y ácido gluconico. Tiene un amplio uso a nivel industrial y comercial, como aditivo en el procesamiento de los alimentos por sus funciones como antioxidante y conservador, para disminuir la concentración de alcohol en la producción de vinos, como biosensor en los dispositivos para la medición de los niveles de glucosa, entre otras. Dos de las especies de hongos que producen GOx son *Aspergillus niger* y *Penicillium amagasakiense*, esta última cataliza la oxidación de la glucosa más eficientemente^{1,2}. En este trabajo se expresó la enzima glucosa oxidasa recombinante (GOxr) producida extracelularmente por *Pichia pastoris*, se modificó y optimizó el gen *gox* de *A. niger* para mejorar su expresión en la levadura y su actividad catalítica.

Parte experimental

Para el diseño del gen *goxM* se tomó solo la región de DNA que codifica a la enzima madura, a esta secuencia se le cambiaron los codones que codifican una Thr por una Ser de la posición 132 y una Thr por una Val de la posición 56 de la secuencia de aminoácidos con la clave AID13306.1. Al inicio de la cadena se le añadió la secuencia de DNA que codifica la señal de secreción del factor α . Se amplificó el gen y se le realizó una doble digestión enzimática con las enzimas *Bam*HI y *Not*I, al igual que al vector pPIC3.5K. La reacción de ligación se llevó a cabo con un relación molar vector:inserto de 1:3 utilizando la enzima T4 DNA Ligasa. Se transformaron células de *E. coli* DH5 α rubidio competentes con el plásmido construido pPIC3.5K-*goxM* para su propagación. Posteriormente se realizó una digestión enzimática del plásmido pPIC3.5K-*goxM* para linearizarlo con la enzima *Sac*I y transformar por electroporación, con 10 μ g de plásmido, células de *P. pastoris* SMD1168 electro-competentes; se realizó el choque eléctrico con las siguientes condiciones: 2500 V, 25 μ F y 200 Ω ; las células se cultivaron en medio selectivo mínimo de dextrosa a 30°C; una vez obtenidas, se les realizó la extracción de DNA genómico con TSNT para posteriormente llevar a cabo una PCR y confirmar la integración del plásmido en el genoma de *P. pastoris*; se utilizó la enzima Dream Taq DNA polimerasa y los primers 5'AOX1 Forward y 3'AOX1 Reverse. Para la expresión se seleccionaron dos clonas portadoras del gen, se crecieron por separado en el medio enriquecido amortiguado adicionado con glicerol a 30 °C con agitación de 250 rpm, y posteriormente se transfirieron las células al medio enriquecido amortiguado adicionado con metanol. Se tomaron muestras del medio a las 48 h, 72 h y 96 h para ser analizadas por SDS-PAGE.

Resultados y Discusión

En el gel de agarosa al 1 % de la figura 1 se observa en los carriles 4 – 6, correspondientes al DNA de *P. pastoris* transformada con el plásmido pPIC3.5K-*goxM*, una banda gruesa entre 2323 pb y 1929 pb, debido a que se encuentran solapadas o muy próximas dos bandas, de las cuales una de ellas es de 2210 pb correspondiente al amplicón del SMC del plásmido pPIC3.5K-*goxM* integrado al genoma de la levadura y la otra corresponde al amplicón de 2200 pb del gen AOX1 de *P. pastoris*, lo que nos indica que esta cepa es Mut+, que se amplifica con los primers 5'AOX1 Forward, la cual se aparea en una región del promotor de este gen y 3'AOX1 Reverse que se aparea a una región del terminador de la transcripción de dicho gen, y esta banda es observada en el carril que corresponde a la transformación de la levadura con el vector pPIC3.5K junto con otra banda de 221 pb que corresponde al amplicón del SMC de este vector^{3,4}.

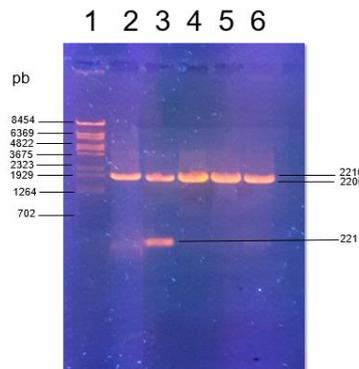


Figura 1. Análisis de la integración de pPIC3.5K-*goxM* al genoma de *P. pastoris* SMD1168. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Carril 1: Marcador de peso molecular λ DNA/*Bst*EII. Carril 2: Control positivo del amplicón del SMC del plásmido pPIC3.5K-*goxM*. Carril 3: *P. pastoris* transformada con pPIC3.5K. Carril 4-6: *P. pastoris* transformada con pPIC3.5K-*goxM*.

En el gel de poliacrilamida al 11 % de la figura 2 se observa en los carriles 4 – 9, correspondientes al medio de cultivo de *P. pastoris* portadora del gen *goxM*, una banda gruesa entre 75 kDa y 50 kDa, esta banda no se encuentra en los carriles 2 y 3 que corresponden al medio de cultivo utilizado como control negativo de *P. pastoris* transformada con el vector pPIC3.5K⁵.

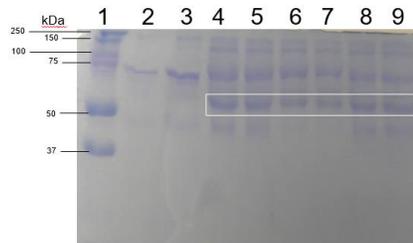


Figura 2. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 11 % de la expresión de GOxr. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2 y 3: Cultivo de 72 h y 96 h de expresión de *P. pastoris* transformada con pPIC3.5K. Carril 4-6: Cultivo de 48 h, 72 h y 96 h de la clona 1 de *P. pastoris* portadora del gen *goxM*. Carril 7-9: Cultivo de 48 h, 72 h y 96 h de la clona 2 de *P. pastoris* portadora del gen *goxM*.

Conclusiones

Se obtuvieron cepas de *Pichia pastoris* SMD1168 portadoras del gen *goxM*. Se logró la expresión de la glucosa oxidasa recombinante, con un peso molecular que se encuentra entre 63 – 75 kDa.

Referencias

1. Wong CM, Wong KH, Chen XD. Appl Microbiol Biotechnol. 2008;78(6):927-938.
2. Bankar SB, Bule M V, Singhal RS, Ananthanarayan L. Biotechnol Adv. 2009;27(4):489-501.
3. Daly R, Hearn MTW. J Mol Recognit. 2005;18(2):119-138.
4. Schwarzhaus J, Wibberg D, Winkler A, Luttermann T. Nat Publ Gr. 2016:1-12.
5. Qiu Z, Guo Y, Bao X, et al. Biotechnol Biotechnol Equip. 2016;30(5):998-1005.