MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE LA LIPASA DE *Thermomyces lanuginosus* EN *Pichia pastoris* EMPLEANDO EL PÉPTIDO SEÑAL α DE *Saccharomyces cerivisiae*

Martha Fabiola Martín del Campo Solís [a], M. Ángeles Camacho Ruíz [a], Abel Gutierrez Ortega [b], R. María Camacho Ruíz [a], Juan C. Mateos Díaz [a], Jorge A. Rodríguez González [a]*
[a] Biotecnología Industrial, [b] Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Av. Normalistas 800, Guadalajara, Jalisco, C.P. 44270, MÉXICO. * e-mail: jrodriguez@ciatej.mx

Resumen
La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) es una de las lipasas más estudiadas y empleadas en la industria debido a su versatilidad, termoestabilidad y acción a pHs alcalinos. Debido a la importancia de esta enzima, en el presente trabajo se decidió evaluar su expresión en la levadura *Pichia pastoris* comparando la eficiencia secretoria del péptido señal α de *Saccharomyces cerevisiae* de 85 aminoácidos comparada con el péptido señal de la TLL de 22. La producción de actividad enzimática encontrada fue 36% mayor al emplear el péptido señal α obteniendo 582 U/mL en comparación con el péptido señal de la TLL con un valor de 427 U/mL ambos a un tiempo de 72 horas de cultivo en la cepa SMD1168H. Estos resultados indican que a pesar de que el péptido señal de la TLL es reconocido por *P. pastoris*, se obtiene una mayor producción al emplear el factor de secreción α de *S. cerevisiae.*

Introducción
Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas EC 3.1.1.3) son enzimas lipolíticas ampliamente distribuidas en la naturaleza que ocupan un lugar prominente como biocatalizadores debido a sus múltiples aplicaciones en oleoquímica, síntesis orgánica, formulación de detergentes y nutrición. La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) es una de las lipasas más estudiadas, actualmente se comercializa en forma soluble en la preparación Lipolase® e inmovilizada como Lipolase TLIM®, y se ha empleado en formulaciones de detergentes desde 1994 por su estabilidad a pHs alcalinos, producción de biodiesel, y producción de químicos finos [1]. Actualmente la TLL recombinante se produce comercialmente en *Aspergillus oryzae,* además se ha expresado también en *Aspergillus niger* resultando un sistema de producción eficiente [2]. *Pichia pastoris,* es un sistema de expresión altamente productivo con muchas aplicaciones comerciales satisfactorias, cuenta con una vía secretoria eficiente en el plegamiento de proteínas y modificaciones postraduccionales lo que la hace atractiva en la producción de proteínas por secreción al medio en forma soluble facilitando su posterior purificación [3]. La selección de un péptido señal es un factor importante en la optimización de la secreción de proteínas en *Pichia pastoris*, el prepropéptido factor α de *Saccharomyces cerevisiae* es el más satisfactorio a la fecha y, aunque *Pichia pastoris* es flexible en el reconocimiento de secuencias señal, la maduración y secreción de la proteína expresada no es predecible, resultando en ocasiones necesario realizar fusiones de señales de secreción especificas para cada caso[4]. En este contexto, en el presente trabajo se evaluó y comparó la producción de la TLL recombinante en *P. pastoris* empleando los péptidos de secreción α de *S. cerevisiae* y el péptido señal propio de la TLL para establecer mejoras en la producción de la enzima.

Metodología

Microorganismos y medios de cultivo.
Los plásmidos pGAPZA y pGAPZαA (Invitrogen) fueron mantenidos y propagados en *E. coli* DH10B en medio LB bajo en sales (g/L: Triptona, 20 (Difco); extracto de levadura (Difco), 10; NaCl (Sigma),5; agar,20 (Bioxon)) y LB+Zeocina (g/L: Triptona, 20; extracto de levadura, 10; NaCl,5; agar,20 y Zeocina (Invitrogen) 25µg/mL). *Pichia pastoris* X-33 (salvaje) y SMD1168H (deficiente en proteasas) de invitrogen fueron empleadas como huésped de expresión y se empleó medio YPD (g/L: Extracto de levadura, 10; peptona (BD), 20; glucosa, 20 (Sigma)) para su crecimiento y medio YPDS+Zeozina 100

© 2014 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-2-8

µg/mL (g/L: Extracto de levadura, 10; peptona, 20; glucosa, 20; sorbitol (Sigma), 1M; agar,20) para la selección de transformantes de *Pichia pastoris.* Todas las cepas y clonas fueron resguardadas a -80°C.

Construcción de plásmidos recombinantes de expresión.

El gen de la lipasa TLL fue clonado direccionalmente empleado los sitios de restricción *Eco*RI y *Kp*nI en los vectores pGAPZA para el péptido señal propio (PSTLL) y pGAPZαA (PSa) para la señal de secreción alfa. El ADNc (NCBI AX512755.1) fue obtenido a partir de la secuencia optimizada (Genscript) para uso por codón de *Pichia pastoris* en el vector PUC57 y fue amplificado por PCR empleando la polimerasa Q5 HF (New England Biolabs), usando los cebadores forward f1PSTLL (5´GGTGAATTCGCCATGAGAAGTTCCCTTGTTTTGTTTTTCGT3´) que comprende el péptido señal propio de la TLL a partir de ADNc, el cebador f4PSαTLL (5´GGTGAATTCGCCGAAGT TTCCCAGGACCTTTTCAACCAATT3´) que comprende la secuencia madura y el cebador reverso r3TLL (5´CCGGGTACCTTACAAGCAGGTTCCGATAAGTCCGAAATACC3´). Posteriormente los vectores pGAPZA y pGAPZαA previamente purificados (Fermentas, GeneJet miniprep) y los productos de amplificación fueron sometidos a doble digestión con las enzimas *Eco*RI y *Kpn*I (New England Biolabs), los productos digeridos fueron purificados a partir de gel de agarosa al 0.8% empleando el kit miniprep Gel extraction (Qiagen). La ligación se llevó a cabo mezclando 30 ng del inserto con 25 ng del vector empleando la ligasa T4 DNA (New England Biolabs) durante toda la noche a 16 °C. Las construcciones resultantes fueron transformadas en *E. coli* DH10B y las transformantes fueron seleccionadas a partir de placas de agar LB-Zeocina. Durante todo el proceso los productos de PCR y transformaciones fueron verificados en geles de agarosa al 0.8% empleando Bromuro de etidio como agente revelador.

Transformación de *Pichia pastoris.*

La transformación de *Pichia pastoris* para permitir el sitio AOX1, los plásmidos recombinantes fueron linealizados con la enzima BspH1 y se purificó pasando por gel de agarosa 1% (p/v). 10 µg de cada plásmido linealizado fueron electroporados con 80 µL de células de *Pichia pastoris* cepas X-33 y SMD1168H, 150 µL de células electroporadas fueron plaqueadas en medio YPDS+Zeocina. Las colonias recombinantes seleccionadas después de 4 días de cultivo a 30 °C fueron confirmadas por PCR empleando los cebadores comerciales fwd-AOX1 y rev-GAP (Invitrogen) y la polimerasa One*Taq*® Hot Start DNA Polymerase.

Expresión de la psTLL y αTLL en *Pichia pastoris* X-33 y SMD1168H.

Se preparó un preinóculo por siembra en agar YPD-Zeocina inclinado inoculando con un asa a partir del resguardo congelado para las clonas PSTLL y PSα en *Pichia pastoris* X-33 y SMD1168H y se incubó durante 5 días a 30 °C. Posteriormente las células fueron cosechadas por resuspensión en 5 mL de medio YPD líquido y se agregaron a 45 mL de medio YPD en matraz de 250 mL para incubarse a 250 rpm y 30 °C durante 24 horas constituyendo el inóculo. Una cantidad suficiente de cada inóculo para ajustar una DO_{600nm} inicial de 1.0 fue agregada a matraces con bafles de 250 mL conteniendo 50 mL de medio YPD; los matraces fueron incubados a 100 rpm y 30 °C durante 72 horas tomando muestras de 3 mL de la expresión cada 24 horas y analizando inmediatamente la $DO_{600nm,}$ el pH y la actividad lipolítica con un método en microplaca.

Determinación de actividad lipolítica.

La actividad lipolítica fue determinada empleando una técnica en micoplaca y tributirina (TC4) como sustrato [5]. Para ello se realizó una emulsión que constó de 9 volúmenes de buffer (conteniendo MOPS (Sigma) 2.5 mM y pH 7.2, NaCl 150 mM) y un volumen de indicador-sustrato que contuvo 4-nitrofenilo (sigma) y TC4 disueltos en terbutanol (Sigma). Una vez preparada la emulsión se agregaron 100 µL por pozo previamente conteniendo 20 µL de la muestra a analizar en la dilución en buffer MOPS 2.5 mM y pH 7.2 adecuada. Inmediatamente después, se incubó en un lector de microplaca a 37 °C y se realizó la

© 2014 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-2-8

cinética durante 15 minutos con lecturas 410 nm cada 30 s. Una unidad fue definida como la cantidad de enzima suficiente para liberar un µmol de ácido butírico provenientes de tributirina en un minuto a las condiciones de ensayo.

Resultados

En la actualidad la producción de enzimas por expresión en sistemas recombinantes es una alternativa atractiva para la obtención de altas cantidades requeridas en la industria. El sistema de expresión de *Pichia~~s~~ pastoris* ha mostrado gran eficiencia en la producción de varias enzimas recombinantes, además de que hay disponibles en el mercado bastantes vectores de clonación para adaptar a las necesidades de producción.

Los vectores pGAPZ incluyen el promotor para el gene *GAP* constitutivo que ha mostrado expresar proteínas en altos niveles en *Pichia pastoris* y el nivel de expresión con el promotor pGAP puede ser ligeramente menor al obtenido con el promotor AOX1 cuya desventaja es el requerimiento de metanol como inductor el cual puede afectar la estabilidad de algunas enzimas. El vector pGAPZα, además incluye el factor de secreción unido a un péptido N-terminal codificando para la señal de secreción α de *Saccharomyces cerevisiae* que ha mostrado una adaptabilidad a la secreción de varias proteínas recombinantes en *Pichia pastoris.* En el presente trabajo se planteó la expresión y secreción de la lipasa TLL con su propio péptido señal (PSTLL) 22 aminoácidos de base en el vector pGAPZA y fusionado al factor alfa (PSa~~α~~) de 84 aminoácidos en el vector pGAPZαA para establecer el mejor sistema de secreción ya que se ha descrito que el empleo del péptido señal nativo de una proteína puede ser una mejor alternativa que el factor α para expresión en *P. pastoris* [4].

En primer lugar, se llevó a cabo la construcción y transformación de los vectores de expresión conteniendo el gen de la TLL a partir del ADNc, se ligó el inserto al vector y se transformó en *E. coli* para obtener el vector de expresión. En la Figura 1 se puede observar la verificación de la construcción a partir de la extracción y análisis de restricción (KpnI y EcoRI) de ADN plasmídico de las clonas seleccionadas posterior a la transformación. En el carril 3 se puede ver el inserto liberado para la clona de resguardo PSTLL (911 pb) incorporada al pGAPZA (2884 pb) y el carril 4 muestra la construcción exitosa de la PSa~~α~~ (861 pb) con el plásmido pGAPZαA e inserto (3147 Kb).

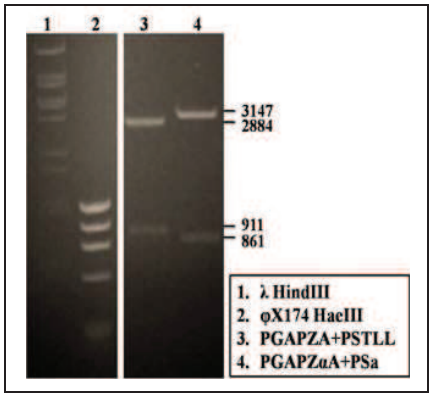

Figura 1.- *Análisis de restricción KpnI+EcoR1 de la construcción de plásmidos recombinantes de la lipasa TLL en los vectores pGAPZA (2884pb) y pGAPZαA (3147pb).*

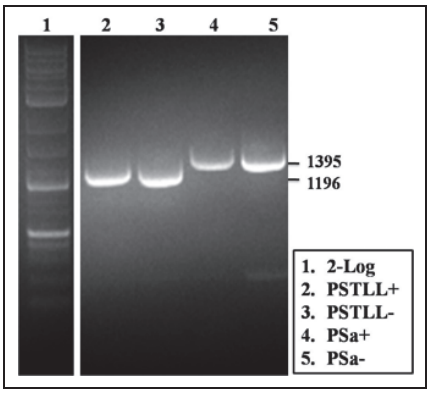

Figura 2.- *Análisis de la inserción del gen genes recombinante TLL en P. pastoris: PSAa (1395pb) y psTLL (1196pb).*

© 2014 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-2-8

Una vez que se obtuvieron las construcciones correctas, se procedió a linealizar y transformar en *P. pastoris* cepas X-33 (ó salvaje) y la cepa SMD1168H (deficiente en proteasas), se decidió realizar la transformación para cada construcción obtenida en ambas cepas con el fin de obtener el extracto con mayor producción y estabilidad a degradación por posible proteólisis. Posteriormente, se procedió a realizar la transformación por electroporación y se cultivó por extensión en placas con YPDS+ Zeocina las células electroporadas. Después de 4 días se analizó el crecimiento y se seleccionaron las colonias para el análisis de la mayor actividad secretada. En la Figura 2 se observa el análisis por PCR de la inserción del gen recombinante de la TLL en *P. pastoris,* donde los signos +/- hacen referencia al empleo de las cepas X-33 y SMD1168H respectivamente. Las amplificaciones para las clonas PSTLL y PSa tuvieron el tamaño esperado en ambas cepas de *P. pastoris* al utilizar los cebadores recomendados, fwd-AOXI y rev-pGAP, para los plásmidos empleados (la diferencia en las longitudes de los productos amplificados se debe a los tamaños de los péptidos señal).

Finalmente, se realizó un estudio de producción de actividad a nivel matraz de las lipasas recombinates para ello, se llevó a cabo una cinética de crecimiento medido por densidad óptica (600nm), así como la determinación de la actividad lipolítica en microplaca a lo largo del cultivo. En la Figura 2(b) puede verse que las cuatro clonas tienen un perfil de crecimiento similar, alcanzando el máximo a las 48 horas con una Densidad óptica (DO_{600nm}) de 16; sin embargo, la producción de actividad lipolítica fue distinta en todos los casos como se observa en la Figura 3(b), donde es notable que las producciones obtenidas con la cepa SMD1168H fueron mayores a las obtenidas con la cepa X-33 para ambos sistemas de secreción, con una actividad máxima 6.4 veces superior para la PSTLL y 2.2 veces PSa~~α~~ evidenciando una mayor eficiencia secretoria para esta cepa. Además, destaca como el péptido señal α tuvo un efecto positivo en la eficiencia de secreción de la enzima; pues, la producción de actividad enzimática medida a las 72 h fue 36% mayor en la clona PSa- (582 U/mL), respecto a la encontrada en la clona PSTLL- (427 U/mL). El análisis de $DO_{600\ nm}$ de los cultivos de las clonas evidenció que las diferencias en la producción de la TLL no se atribuyen al crecimiento (Figura 3(a), ya que la densidad de la biomasa observada fue similar en todos los cultivos.

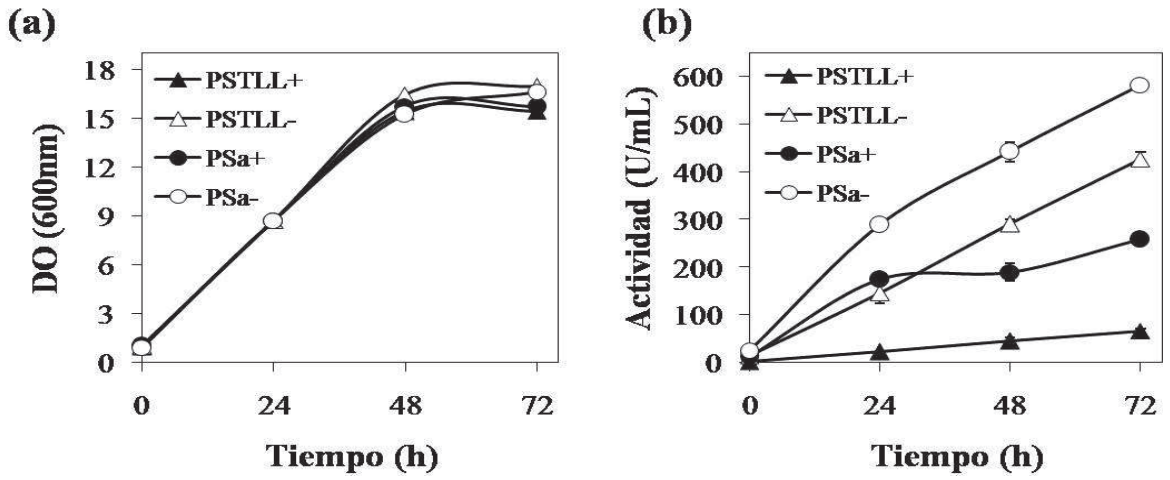

Figura 3.- *(a) Cinéticas de producción de TLL recombinante. (b) Crecimiento de las clonas PSTLL y PSa en las cepas X-33 (+) y SMD1168H (-).*

Conclusiones

© 2014 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-2-8

Se observó que *Pichia pastoris* es capaz de reconocer la señal de secreción propia de la TLL, sin embargo el potencial secretorio del factor α de *S. cerevisiae* fue mejor debido a que se aumentó la actividad lipasa secretada en el medio de cultivo a las mismas concentraciones de biomasa a las 72 h en un 36%, logrando una mayor producción el emplear la cepa SMD1168H y esta señal de secreción. Por lo que estos resultados sugieren que en el caso de la TLL, es mejor emplear el péptido señal α en *Pichia pastoris* para tener una mayor excreción al medio de cultivo y producción de la TLL en forma activa.

Agradecimientos
M. Martin del Campo y A. Camacho agradecen el financiamiento de beca doctoral otorgado por el CONACyT.

Referencias

1. Fernandez-Lafuente, R., "Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst″, in *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 62, No. 3–4, p. 197-212, 2010.
2. Prathumpai, W., et al., "Lipase production by recombinant strains of Aspergillus niger expressing a lipase-encoding gene from Thermomyces lanuginosus″, in *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 65, No. 6, p. 714-719, 2004.
3. Macauley-Patrick, S., et al., "Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system″, in *Yeast*, Vol. 22, No. 4, p. 249-270, 2005.
4. Vadhana, A.K.P., et al., "Improved secretion of Candida antarctica lipase B with its native signal peptide in Pichia pastoris″, in *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 52, No. 3, p. 177-183, 2013.
5. Mateos, D.E., et al., "High-Throughput screening method for lipases/esterases″, in *Lipases and phospholipases: methods and applications*, Vol. No. p. 2012.

.

© 2014 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-2-8