



## Producción de una fitasa recombinante en *Pichia pastoris*

MARTHA GUERRERO OLAZARÁN\* , LILÍ RODRÍGUEZ BLANCO\* , JOSÉ MA. VIADER SALVADÓ\*



El ácido fítico (hexafosfato de inositol, IP6) es considerado como un factor antinutricional por su acción quelante de minerales y la interacción con proteínas importantes en la nutrición.<sup>1</sup> En la última década, numerosas pruebas experimentales han demostrado que la aplicación de fitasas en la producción de piensos con ingredientes vegetales con alto contenido en ácido fítico, mejora la disponibilidad del fósforo y otros nutrientes, tanto en aves como en cerdos, aumenta el rendimiento de su producción y representa un ahorro estimado en millones de dólares anuales, además de la consecuente reducción del deterioro ambiental asociado a la contaminación causada por fósforo.<sup>2,3</sup> A pesar de que hasta el momento la aplicación de fitasas se ha enfocado a la alimentación animal, existe un gran potencial para la aplicación de estas enzimas en el procesado y fabricación de alimentos para consumo humano.<sup>4</sup>

Las fitasas disponibles en el mercado son, por lo

general, de origen fúngico, del género *Aspergillus*, y éstas han sido optimizadas principalmente para su empleo en la producción de cerdos y aves. La optimización de la eficiencia de las fitasas se ha enfocado al desarrollo de fitasas con alta actividad catalítica a valores de pH de 2 a 5 y a las temperaturas del tracto gastrointestinal de especies animales monogástricas terrestres, estabilidad a altas temperaturas y resistencia a las enzimas proteolíticas digestivas.<sup>2,3</sup> No obstante, en el mercado no existe una fitasa ideal de aplicación universal, ya que ésta debería ser efectiva en diferentes especies animales, y estable al almacenamiento y al tratamiento térmico durante el procesado de los alimentos, además de competitiva en costos de producción.<sup>2,3</sup>

Muchas especies de gran importancia económica, como el caso camarón, aún no han sido beneficiadas con el empleo de fitasas en su nutrición.<sup>5</sup> De acuerdo a los criterios antes descritos, una fitasa adecuada para su empleo en la nutrición de camarón, debería tener actividad a valores de pH de 7 a 8 y a la temperatura del tracto digestivo de la especie en cuestión, además de resistencia al ataque proteolítico de las enzimas digestivas. Por otro lado, se requiere que estas fitasas posean estabilidad a las temperaturas empleadas en el procesado de los ali-

□ El presente artículo está basado en la investigación "Producción de una fitasa recombinante en *Pichia pastoris* para su potencial aplicación en la nutrición de camarón", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2007 en la categoría de Ciencias Naturales, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2007.

\*Instituto de Biotecnología, FCB-UANL,  
Tel. (81) 8329-4110 ext. 6439  
e-mail: mguerrer@fcb.uanl.mx

mentos y en el caso de especies marinas cultivables, una lixiviación limitada de la fitasa adicionada al alimento. A pesar de que la efectividad de algunas de las fitasas comerciales ha sido evaluada en peces, existen escasos reportes en cuanto a la eficacia en la nutrición del camarón.<sup>5</sup>

Las fitasas reportadas del género *Bacillus* son estructuralmente diferentes a las fitasas fúngicas comerciales, por lo que también poseen propiedades fisicoquímicas diferentes. De acuerdo a sus características bioquímicas, se considera que las fitasas del género *Bacillus* son candidatas potenciales para su empleo como aditivo en la alimentación de animal.

*Pichia pastoris* ofrece múltiples ventajas respecto a la producción de proteínas recombinantes,<sup>6</sup> habiendo mostrado ya resultados satisfactorios con la producción de otras fitasas.<sup>7</sup> Las características de las fitasas del género *Bacillus* y las ventajas que ofrece *Pichia pastoris* como hospedero para la producción industrial de proteínas recombinantes son factores favorables para producir la forma recombinante de estas fitasas bacterianas en este hospedero, y para considerar su potencial su aplicación en la nutrición animal.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue construir cepas recombinantes de *Pichia pastoris* capaces de producir y secretar una fitasa de origen bacteriano, factible de ser empleada como aditivo en alimentos para la nutrición de especies como el camarón, además de su aplicación en el procesado de harinas de origen vegetal con alto contenido de ácido fítico.

## Materiales y métodos

De acuerdo a las propiedades bioquímicas documentadas en la literatura, se seleccionó la fitasa codificada por el gen *phyC* de *Bacillus subtilis*.<sup>8</sup> El sistema de expresión de *Pichia pastoris*, cepa GS115 (*Invitrogen Corp.*), provinieron de la colección de cepas del laboratorio y el plásmido TOPO pCR 2.1 de *Invitrogen Corporation* (*San Diego Ca., USA*).

El gen *phyC* de la fitasa de *B. subtilis* se obtuvo mediante amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando la enzima *Isis* DNA polimerasa (*Qbiogene*), DNA genómico de *B. subtilis* y oligonucleótidos iniciadores de PCR diseñados

específicamente para este trabajo con el fin de introducir los sitios de restricción *Xho* I y *Avr* II en los extremos 5' y 3', respectivamente, del producto amplificado.

El producto amplificado del gen *phyC* se clonó primero en el vector TOPO, y posteriormente se digirió con las enzimas *Xho* I (*Roche Molecular Systems, Inc.*) y *Avr* II (*Amersham Biosciences Co.*) para la subclonación posterior en el vector de expresión pPIC9. El vector pPIC9hGH22K fue digerido con las enzimas *Xho* I y *Avr* II y reemplazado el fragmento liberado por el gen *pick*, mediante ligación con *T<sub>4</sub>* DNA ligasa (*Promega Co.*), dando lugar al nuevo plásmido pPIC9*phyC* de 9,064 pb. Este plásmido fue caracterizado por PCR, empleando los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *phyC* de *B. subtilis* y por su patrón de restricción con las enzimas *EcoR* I y *Pst* I (*Promega Co.*). Todas las manipulaciones se realizaron de acuerdo a metodologías estandarizadas.<sup>9,10</sup>

La construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del gen *phyC* de *B. subtilis*, se efectuó mediante la transformación por la técnica de esferoplastos<sup>11</sup> de la cepa GS115 de *P. pastoris* con el vector construido pPIC9*phyC* digerido previamente con la enzima *Sal* I (*Promega Co.*). Las células transformadas se seleccionaron por auxotrofia a histidina (transformantes GS115 His<sup>+</sup>), y se caracterizaron por su genotipo mediante PCR, y fenotipo mediante cinéticas de crecimiento, detección de transcritos de *phyC*, análisis de proteínas y actividad enzimática de fitasa C de cepas cultivadas bajo condiciones de inducción del gen heterólogo clonado.

La caracterización genotípica se realizó determinando por PCR la presencia del gen *AOX1* y el gen heterólogo en el genoma de cada cepa mediante protocolos previamente descritos.<sup>10,12</sup>

El fenotipo Mut<sup>+</sup> de una de las cepas seleccionadas se analizó a través de la capacidad de utilizar el metanol como única fuente de carbono, determinando la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación de la cepa cultivada bajo condiciones de inducción de acuerdo a la metodología previamente reportada.<sup>10,12</sup>

La detección de transcritos de fitasa C se llevó a cabo mediante ensayos de retrotranscripción acoplados a PCR (RT-PCR), empleando RNA total del

paquete celular de un cultivo con 48 h de inducción de una las cepas seleccionadas,<sup>13</sup> oligo(dT) y los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *phyC* de *B. subtilis*.

El fenotipo *phyC*<sup>+</sup> se realizó por la detección de la fitasa C secretada al medio de cultivo en cepas transformadas y cultivadas bajo condiciones de inducción, mediante el análisis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y determinación de la actividad enzimática de fitasa.<sup>13</sup>

La determinación de la actividad de fitasa se llevó a cabo mediante una modificación del método descrito por Kim *et al.*,<sup>14</sup> empleando mezclas de reacción con una alícuota del sobrenadante de cultivos inducidos, 1.6 mM de fitato de sodio, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) y 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Después de incubar a 37°C por 30 min, se detuvo la reacción con un volumen de ácido tricloroacético a 15% en agua (w/v). El fosfato inorgánico liberado a partir del ácido fítico se determinó por espectrofotometría a 820 nm mediante el método del ácido ascórbico.<sup>14</sup> Se consideró una unidad de fitasa como la cantidad de enzima que liberó 1 μmol de fosfato en 1 minuto bajo las condiciones evaluadas. Para el cálculo de la actividad específica de la fitasa se determinaron proteínas totales de los sobrenadantes de los cultivos por el método de Bradford<sup>15</sup> y se expresó el resultado en U/mg de proteína.

El análisis de proteínas por SDS-PAGE se realizó en alícuotas de los sobrenadantes de cultivos inducidos por 72 h, previamente concentrados 20 veces y diafiltrados por ultrafiltración en unidades de 10 kDa Amicon-Ultra-4 (Millipore, MA, USA).

La inducción de las cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del DNA que codifica para la fitasa C de *B. subtilis* se realizó en cultivos a nivel matraz en tres fases, preparación del inóculo, obtención de biomasa y, por último, la inducción de la expresión del gen heterólogo durante 72 h, siguiendo protocolos previamente descritos.<sup>13,16</sup>

Se evaluó la producción de fitasa C recombinante mediante la determinación de actividad enzimática en el medio de cultivo libre de células, se optimaron las condiciones de cultivo para aumentar los niveles de producción de la enzima por las cepas recombinantes y se seleccionó la cepa más productora de la fitasa C recombinante.<sup>13</sup>

## Resultados y discusión

Los oligonucleótidos empleados para facilitar la clonación del gen *phyC* en el vector pPIC9 estuvieron diseñados en forma adecuada, ya que generaron una única banda de 1,089 pb al amplificar el DNA genómico de *B. subtilis*, correspondiente a la secuencia del gen *phyC* que codifica para la fitasa C. El diseño de oligonucleótidos con colas en sus extremos 5' que incluyan los sitios de restricción *Xho* I y *Avr* II, además de parte de la secuencia del péptido señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, ha sido empleada con anterioridad con éxito por otros autores.<sup>10,17</sup>

El vector pPIC9*phyC* de 9,064 pb construido contiene la secuencia que codifica para la proteína madura de la fitasa C de *B. subtilis*,<sup>8</sup> la cual se encuentra en marco de lectura con la secuencia señal del factor alfa de *S. cerevisiae* y el promotor AOX1, para conducir su expresión y secreción de la proteína recombinante hacia el medio de cultivo.

De las 17 cepas GS115 transformantes His<sup>+</sup> aisladas, 76% fue positiva en el análisis de integración del gen heterólogo en el genoma de *P. pastoris*. Este análisis realizado por PCR (figura 1), mostró la presencia de la banda derivada del locus AOX1 (2,107 pb) y la banda derivada del casete de expresión integrado (1,534 pb), indicando la integridad estructural de AOX1 y la integración del casete de expresión en el genoma de *P. pastoris*. Estos resultados también confirman que las transformantes obtenidas presentaron el fenotipo Mut<sup>+</sup>. Este fenotipo también fue confirmado con los parámetros de crecimiento de cultivos crecidos bajo condiciones de inducción, ya que el tiempo de duplicación en metanol fue de 5.8 h para las cepas recombinantes y de 5.3 h para una cepa control con fenotipo Mut<sup>+</sup>. Además, estos valores de tiempos de duplicación han sido descritos<sup>12,18</sup> para otras cepas recombinantes de *P. pastoris* con fenotipo Mut<sup>+</sup>.

El crecimiento inalterado en metanol de las cepas recombinantes construidas manifiesta la ausencia de algún efecto tóxico debido a la expresión del gen heterólogo sobre el hospedero.

El evento de expresión génica fue confirmado por la detección por RT-PCR de transcritos del gen *phyC*, a partir de muestras de cultivos inducidos.

Una banda de 1,083 pb obtenida a partir de RNA total confirmó la presencia de transcritos de este gen, producidos durante la inducción del gen heterólogo con metanol.

El análisis por SDS-PAGE de las proteínas extracelulares de los cultivos de cepas crecidas bajo condiciones de inducción mostró la presencia de una banda difusa entre 45 y 60 kDa. Debido a que el peso molecular aparente por SDS-PAGE reportado para la fitasa C es de 43 kDa,<sup>8</sup> se concluyó que la fitasa recombinante obtenida se sintetiza de forma glicosilada.

En la figura 2 (gráfica superior) se muestran los niveles de proteínas secretadas al medio de cultivo de cada una de las 14 cepas evaluadas, los cuales estuvieron comprendidos entre 18 y 29 µg/mL de proteínas.

La figura 2 (gráfica inferior) muestra los niveles de actividad enzimática de fitasa C secretada al me-

diógeno entre los cultivos de las diferentes cepas, las diferencias encontradas en los niveles de producción de la fitasa C funcional en las diferentes cepas analizadas, pueden ser debidas a la variación entre clonas que se presenta por una integración heteróloga del casete de expresión en el genoma del hospedero.<sup>19</sup>

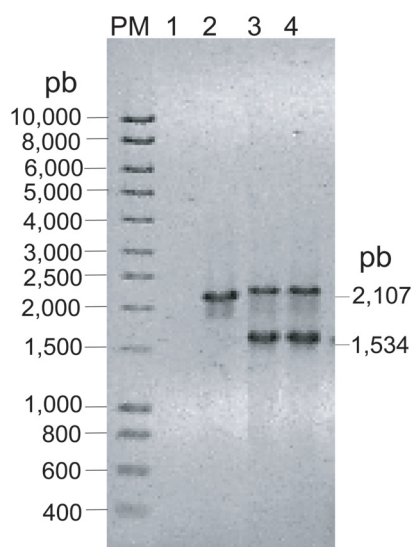


Fig. 1. Análisis de integración del gen *phyC* en el genoma de *P. pastoris*. Gel de agarosa a 0.8% de los productos amplificados por PCR. PM: Marcador de peso molecular (Hiper ladder I), carril 1: control negativo, carril 2: DNA genómico de GS115, carriles 3-4: DNA genómico de cepas GS115*phyC*.

dió de cultivo de las 14 cepas evaluadas. Estos valores estuvieron comprendidos en un intervalo de 0.13 a 0.75 U/mL. Tres cepas mostraron los niveles más altos de actividad enzimática con valores de 0.55 a 0.75 U/mL, correspondientes a una actividad específica de 25-35 U/mg de proteína.

Ya que las condiciones de cultivo y las densidades celulares iniciales se controlaron de forma ho-

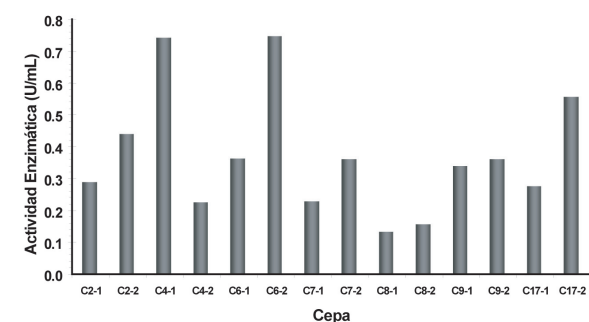
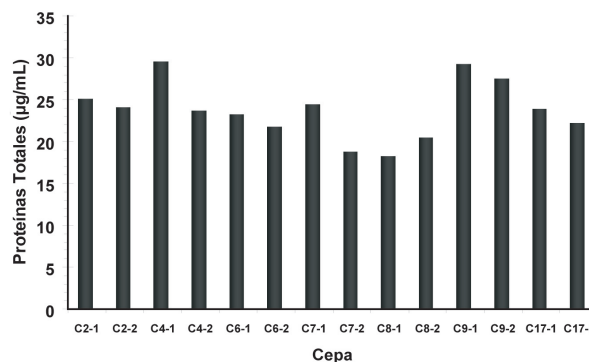


Fig. 2. Niveles de producción de proteínas totales extracelulares (gráfica superior) y actividad enzimática para fitasa C (gráfica inferior) de cepas recombinantes GS115*phyC* cultivadas por 72 h bajo condiciones de inducción.

Los mejores niveles de actividad enzimática para la fitasa C recombinante se alcanzaron en cultivos de 25 mL con la cepa GS115*phyC*-C6-2 (0.75 U/mL), ocho veces más altos que los reportados para la fitasa C nativa (0.096 U/mL), producida en cultivos de *B. subtilis* a nivel matraz<sup>8</sup> y tres veces más altos que los reportados para otra fitasa de *B. subtilis* (0.24 U/mL) descrita por Powar y Jagannathan.<sup>20</sup> La fitasa C nativa se ha producido en cultivos de 5 L con niveles de 2.1 U/mL.<sup>21</sup> Sin embargo, se espera que la producción de la fitasa C recombinante en *P. pastoris* en un biorreactor incrementará a niveles al menos 100 veces mayores que los obtenidos

en matraz, por lo tanto, superarán a los niveles producidos en su forma nativa previamente reportados.<sup>8,20-22</sup>

Todas las fitasas bacterianas del género *Bacillus* reportadas en la literatura<sup>3,8,20-22</sup> se secretan al medio de cultivo con otras proteínas extracelulares, conduciendo a niveles de actividad específica más bajos que los obtenidos con la fitasa C recombinante producida en *P. pastoris* en este trabajo.

Debido a sus propiedades bioquímicas, las fitasas del género *Bacillus* están consideradas como una alternativa a las fitasas fúngicas para su aplicación en áreas que estas últimas no pueden ser empleadas como aditivo de alimentos y en el procesamiento de harinas de origen vegetal con alto contenido de ácido fítico.<sup>22</sup>

## Conclusiones

En el presente estudio se demostró que el gen *phyC* de *B. subtilis*, que codifica para la fitasa C, puede ser expresado en *P. pastoris* y su producto proteico se produce como una enzima funcional. Los niveles de actividad enzimática y actividad específica para la fitasa C recombinante obtenidos en este trabajo, superan a los reportados para la fitasa nativa, y éstos son factibles de ser incrementados en procesos de alta densidad celular empleando biorreactores, tal como se ha logrado para la producción de otras fitasas en *P. pastoris*. Por lo cual se considera que este hospedero ofrece una alternativa para la producción industrial de esta enzima de gran interés para su aplicación en alimentación animal y nutrición humana.

## Resumen

En el presente trabajo se construyeron cepas recombinantes de *Pichia pastoris* capaces de producir y secretar una fitasa de origen bacteriano, factible de ser empleada como aditivo en alimentos para animales. Las células recombinantes construidas produjeron en 72 h de cultivo hasta 0.75 U/mL de la fitasa C de *Bacillus subtilis*, superando los valores reportados para las producción de la fitasa C nativa. *Pichia pastoris* ofrece una alternativa competitiva para la producción de esta fitasa bacteriana.

**Palabras clave:** Fitasa, *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis*, Aditivos de alimentos .

## Abstract

In the present work, recombinant strains of *Pichia pastoris* were created which produce and secrete a bacterial phytase, which in turn has a significant applied value as a feed additive. The constructed recombinant strains produced during a 72-h period cultures up to 0.75 U/mL of *Bacillus subtilis* phytase C, overcoming the reported values for the production of native phytase C. *Pichia pastoris* offers a competitive alternative for production of this bacterial phytase.

**Keywords:** Phytase, *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis*, Feed additives.

## Agradecimientos

Agradecemos el apoyo otorgado por el Paicyt-UANL y Sagarpa-Conacyt (2-2003-03-141). A Eddy L. Cab Barrera, J. Gerardo Carreón Treviño, J. Antonio Fuentes Garibay y a J. Antonio Gallegos López por el apoyo técnico brindado. LRB agradece al Programa Institucional Promep-UJAT de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, la beca otorgada.

## Referencias

1. Cheryan M. (1980). Phytic acid interactions in food systems. CRC. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 13: 297-302.
2. Lei X.G.; Stahl C.H. (2001). Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. Appl Microbiol Biotechnol. 57(4): 474-481.
3. Vohra A; Stayanarayana T. (2003). Phytases microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Crit. Rev. Biotechnol. 23(1):29-60. Review.
4. Greiner R.; Konietzny U. (2006). Phytase for Food Application, *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) 125-140.
5. Baruah K.; Sahu, N.P.; Pal AK.; Debnath D. (2004). Dietary phytase: An ideal approach for a

- cost effective and low-polluting aquafeed. NAGA, Worldfish Centre Quarterly. 27(3-4): 15-19.
6. Ilgen C.; Lin-Cereghino J; Cregg J.M. (2005) *Pichia pastoris* In: Production of Recombinant Proteins - Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems (Gellissen, G., Ed.), pp. 143-162. Wiley-VCH, Weinheim
  7. Rodríguez E.; Mullaney, E.J.; Lei X. G. (2000). Expression of the *Aspergillus fumigatus* Phytase Gene in *Pichia pastoris* and Characterization of the Recombinant Enzyme. Biochem Biophys Res Commun 268, 373-378
  8. Kerovuo J.; Lauraeus M.; Nurminen P.; Kalkkinen. N.; Apajalahti J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 64(6):2079-2085.
  9. Sambrook J.; Fritsch E.F.; Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2a. edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
  10. Escamilla-Treviño L. L. (2002). Producción de tripsina del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) en *Pichia pastoris*. Tesis de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología de la Facultad de Biología, U.A.N.L., San Nicolás de los Garza, N.L. (México).
  11. Cregg J.M.; Russell K. A. (1998). Transformation. in: *Pichia* Protocols Methods in Molecular Biology. (Higgins D.R.; Cregg, J. M., Eds.) Vol.103, Humana Press Inc, Totowa, NJ, 27-39.
  12. Mendoza-Muñoz B. S. (2006). Caracterización fenotípica y genotípica de cepas recombinantes de *Pichia pastoris*. Tesis de licenciatura de la carrera de químico bacteriólogo parasitólogo de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., San Nicolás de los Garza, N.L. (México).
  13. Rodríguez-Blanco L. (2006). Producción de una fitasa recombinante en *Pichia pastoris* para su potencial aplicación en la nutrición de camarón. Tesis de doctorado en ciencias, con especialidad en biotecnología, en la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., San Nicolás de los Garza, N. L. (México).
  14. Kim Y.O.; Kim H. K.; Bae K.S.; Yu J. H.; Oh T. W. (1998a). Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. Enzyme Microb. Technol. 22: 2-7.
  15. Bradford M .A. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
  16. Escamilla-Treviño L. L.; Viader-Salvadó J.M.; Barrera-Saldaña H.A.; Guerrero-Olazarán, M. (2000). Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. Biotechnol. Lett. 22 109-114.
  17. Ascacio-Martínez J. A.; Barrera-Saldaña H. A. 2004. Production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormona by *Pichia pastoris*. Gene. 340: 261-26.
  18. Stratton J.; Chiruvolu V.; Meagher M. (1998). High cell-density fermentation. In: *Pichia* Protocols. Methods in Molecular Biology, Higgins DR and Cregg JM (Eds). Humana Press Inc.: New Jersey, pp. 107-120.
  19. Viader-Salvadó J. M.; Cab-Barrera E. L.; Galán-Wong L .J.; Guerrero-Olazarán M. (2006). Genotyping of recombinant *Pichia pastoris* strains. Cell. Mol. Biol. Lett. 11(3): 348-359.
  20. Powar V.K.; Jagannathan V. (1982). Purification and properties of phytase-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 151: 102-108.
  21. Apajalahti J.; Heikkinen P.; Kerovuo J.; Lauraeus M.; Morgan A.; Nurminen P.; Silkanen O. (2003). Phytase from *Bacillus subtilis*, gene encoding said phytase, method for its production and use. United States Patent Application. Publ. No. US 6 638 746 B2.
  22. Rodríguez E.; Mullaney, E. J.; Lei X. G. (2000). Expression of the *Aspergillus fumigatus* Phytase Gene in *Pichia pastoris* and Characterization of the Recombinant Enzyme. Biochem Biophys Res Commun 268, 373-378

Recibido: 7 de septiembre de 2007

Aceptado: 17 de septiembre de 2007