



Diseño y producción en *Pichia pastoris* de fitasas termoestables con estructura de hélice

JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ*, JUAN ANTONIO GALLEGOS LÓPEZ*,
MARTHA GUERRERO OLAZARÁN*



Las fitasas son hidrolasas monoméricas que catalizan la liberación de los fosfatos del ácido fítico (hexafosfato de inositol) o fitatos, la principal fuente de fósforo almacenado en semillas usadas como ingredientes de alimentos de animales.¹ Los animales monogástricos y agástricos, como cerdos, pollos y peces, no pueden utilizar el fósforo de los vegetales, debido a que su tracto gastrointestinal es deficiente en enzimas con actividad de fitasa.¹ Por lo tanto, estas enzimas tienen un gran valor como aditivo de alimentos de animales.

La mayoría de las fitasas disponibles comercialmente son de la clase fosfatasa ácida de histidina, y son de origen fúngico (género *Aspergillus*). Estas fitasas poseen actividad catalítica en un

intervalo de pH de 2.5 a 6. Por otro lado, fitasas bacterianas del género *Bacillus*, con estructura de hélice, poseen pH óptimo cercano a 7,^{2,3} lo que las hace de especial interés como aditivo de alimentos para animales con tracto gastrointestinal neutro-básico. Debido a que los alimentos de animales frecuentemente se peletizan, una fitasa adecuada como aditivo de alimentos de animales debería resistir las temperaturas del proceso de peletizado.

El diseño de proteínas dirigido por datos o información es una estrategia de ingeniería de proteínas que permite mejorar la termoestabilidad de proteínas. Esta estrategia usa secuencias aminoácidas y estructuras de proteínas disponibles en las bases de datos para predecir aminoácidos potencialmente estabilizantes, que serán objetivos para realizar mutaciones. Específicamente, se pueden predecir aminoácidos estabilizantes a partir de secuencias aminoácidas consenso de

□ El presente artículo está basado en la investigación "Diseño y producción en *Pichia pastoris* de fitasas termoestables con estructura de hélice" galardonada con el Premio de Investigación UANL 2011, en la categoría de Ciencias Naturales, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario, en septiembre de 2011.

*Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Ave. Pedro de Alba s/n, Col. Ciudad Universitaria, 66450, San Nicolás de los Garza, N.L., México
e-mail: jose.viadersl@uanl.edu.mx

proteínas homólogas, y de este modo se reduce el número de mutantes candidatos a ser probados experimentalmente. Una mejora adicional al diseño de proteínas dirigido por datos o información es el concepto consenso guiado por estructura, el cual combina la ingeniería de secuencias consenso y la información estructural de las proteínas. Esta estrategia de diseño de proteínas reduce aún más el número de proteínas candidatas a ser analizadas para evaluar su termoestabilidad.⁴

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* se ha desarrollado como un hospedero para la producción y secreción de proteínas heterólogas.⁵ Las estrategias de ingeniería de proteínas que usan *P. pastoris* como hospedero pueden mejorar la termoestabilidad de la proteína y, simultáneamente, realizar su sobreproducción. Por este motivo, diseñamos nuevas fitasas con estructura de hélice con alta probabilidad de ser termoestables y con actividad a pH neutro, usando el concepto consenso guiado por estructura y un grupo de secuencias aminoácidas de fitasas del género *Bacillus*. Modificamos genéticamente a cepas de *P. pastoris* para introducir las secuencias codificantes de las fitasas con los codones preferenciales de *P. pastoris* y sobreproducir las fitasas diseñadas. Además, se caracterizaron bioquímicamente las fitasas producidas, y se correlacionó su termoestabilidad con la estructura de las proteínas.

Materiales y métodos

Diseño de secuencias aminoácidas

Las secuencias aminoácidas de fitasas (FTE y FTEII) se diseñaron como fitasas con estructura de hélice mediante el concepto consenso guiado por estructura, al combinar dos métodos: a) el concepto consenso para la ingeniería de la termoestabilidad de proteínas^{6,7} a partir de 15 secuencias aminoácidas de fitasas del género *Bacillus*, b) un análisis de modelaje por homología para determinar aminoácidos estabilizantes, usando la estructura tridimensional de la fitasa

de *B. amyloliquefaciens* (código PDB 2POO). La determinación de la secuencia consenso se realizó con el programa Bioedit v7.0.8.0.⁸ Además, se consideró a una fenilalanina como un primer residuo artificial de la proteína madura, para aumentar la eficiencia de corte de la secuencia prepro del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* por la proteasa Kex2.⁹⁻¹¹

Construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris*

La secuencia codificante de la fitasa FTE (gen *fte*) se diseñó con los codones preferenciales de *P. pastoris*.¹² Se removieron secuencias ricas en adeninas y timinas, introduciendo mutaciones silenciosas para evitar la terminación temprana de la transcripción. Además, se introdujeron sitios *XhoI* y *AvrII* en los extremos 5' y 3' del gen *fte*, respectivamente, para su apropiada ligación en el vector pPIC9. Se incluyó parte de la secuencia nucleotídica de la secuencia prepro del factor alfa de *S. cerevisiae* en el extremo 5'. La secuencia nucleotídica diseñada fue sintetizada, clonada en el vector pUC57, y secuenciada por la compañía GenScript Corp. (Piscataway, NJ).

El gen *fte* se mutó en los correspondientes nucleótidos para generar la mutación N336D, y así sintetizar el gen *fteII*. De la misma forma, el gen *fteII* se mutó en F29K, V81A, y K292Q para dar el gen *fta* que codifica para la fitasa de *B. amyloliquefaciens*. Ambos ensayos de mutagénesis se realizaron con el kit QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA). Las secuencias nucleotídicas de los genes *fte*, *fteII* y *fta* fueron confirmadas por secuenciación nucleotídica en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Los vectores de expresión pPIC9*fte*, pPIC9*fteII* y pPIC9*fta* se obtuvieron por digestión de los respectivos plásmidos pUC57 con las enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII*, y posterior ligación en el vector pPIC9. La correcta construcción de estos

vectores se confirmó por análisis de restricción con *Xho*I y *Avr*II, y por PCR.¹³

La transformación de células químicamente competentes de *P. pastoris* KM71 se realizó con los plásmidos pPIC9*fte*, pPIC9*fte*II y pPIC9*fba* linearizados previamente con *Sall*. Se seleccionaron transformantes en placas sin histidina (RDB-agar).

Producción de las fitasas recombinantes

Para seleccionar una cepa sobreproductora de cada fitasa, se realizaron cultivos de las cepas recombinantes, primero en medio BMG; posteriormente en medio BMM-CaCl₂. El medio de cultivo libre de células se recuperó por centrifugación, y se determinó la actividad de fitasa (U/mL). La producción extracelular de fitasa por célula se calculó como el cociente entre la actividad de fitasa del medio de cultivo libre de células y la concentración celular, teniendo en cuenta que una DO₆₀₀ corresponde aproximadamente a 10⁷ células/mL.¹⁴ Las cepas que generaron la mayor producción de fitasas por célula se consideraron sobreproductoras.

El efecto del uso de los codones preferenciales de *P. pastoris* en los niveles de expresión de los genes *fte*II y *fba* se determinó al comparar los niveles de expresión de cada cepa sobreproductora con los niveles de expresión de las cepas de *P. pastoris* GS115 Mut⁺ (GS115PhyC) y KM71 Mut⁺ (KM71PhyC) sobreproductoras de la fitasa C recombinante de *B. subtilis* (PhyC-R), previamente construidas en nuestro laboratorio.^{15,16}

Cada cepa sobreproductora se usó para producir cada fitasa recombinante creciendo las células en 600 mL de medio BMG por 12 h, y posteriormente, en 120 mL de medio BMM-CaCl₂. Todos los pasos posteriores de purificación de las fitasas se llevaron a cabo a 4°C. Cada medio de cultivo libre de células se concentró 20 veces por ultrafiltración (Centricon Plus 70 de 10 kDa, Millipore, MA). Con cada concentrado enzimático se realizó una purificación adicional de la

fitasa con el sistema de cromatografía Biologic LP (Bio-Rad, Hercules, CA), y una columna de intercambio aniónico HiTrap Q FF (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). La relación entre la actividad de fitasa y la concentración de proteínas de la fracción cromatográfica con la máxima actividad de fitasa se consideró como la actividad específica de la fitasa purificada. Todas las determinaciones de concentración de proteínas se realizaron mediante el método de Bradford, usando albúmina sérica bovina como estándar.

Actividad de fitasas

La actividad de fitasa se determinó en todos los medios de cultivo libres de células, en los concentrados proteicos por ultrafiltración y en las fracciones cromatográficas. Los medios de cultivo libres de células se desalaron previamente con una columna PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Se empleó fitato de sodio como sustrato, y se midió espectrofotométricamente el fosfato liberado.¹⁶ Se consideró una unidad de fitasa como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de fosfato en un minuto en las condiciones del ensayo.

Caracterización bioquímica de las fitasas

Mediante el cambio en la movilidad electroforética de las proteínas tratadas con Endo H_f en un gel de SDS-poliacrilamida teñido con azul de Comassie, se evaluó la posible N-glicosilación. Se determinó la secuencia del extremo N-terminal de las fitasas previamente desglucosiladas, separadas mediante electroforesis y transferidas a membranas de PVDF (Millipore, Bedford, MA). Estos análisis se realizaron en la Oficina de Biotecnología de la Universidad del Estado de Iowa, empleando el secuenciador 494 de Perkin Elmer-Applied Biosystems. Se determinó el efecto del pH en la actividad enzimática de cada fitasa a 37°C con soluciones amortiguadoras de glicina-

HCl (pH 2.5), acetato de sodio (pH 5.5), y Tris-HCl (pH 7.5 y 9.0). También se determinó el efecto de la temperatura en la actividad enzimática de cada fitasa al medir la actividad de la fitasa a varias temperaturas (25-80°C). La termoestabilidad de cada fitasa se evaluó al medir la actividad de la fitasa residual, después de incubar a 25-80°C por 10 min en soluciones amortiguadoras de Tris-HCl (pH 7.5) o acetato de sodio (pH 5.5), en presencia de 1 ó 5 mM CaCl_2 . Además se evaluó la termoestabilidad de PhyC-R, con fines comparativos.

Todos los resultados se compararon entre grupos estadísticos con un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación múltiple de Tukey, con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Análisis computacional de modelos tridimensionales

Entre todas las fitasas estudiadas, PhyC y FBA son la pareja más diferente en su secuencia aminoacídica, diferenciándose en 28 residuos de aminoácidos. El impacto de estos residuos en la estabilidad de la estructura de las cuatro fitasas se evaluó con los programas Swiss-PdbViewer 4.0¹⁷ e iMolTalk¹⁸ con modelos moleculares que fueron construidos mediante modelaje por homología, usando SWISS-MODEL 8.05¹⁹ y la estructura tridimensional de la fitasa de *B. amyloliquefaciens* (PDB 2POO) como plantilla.

Los sitios potenciales de N-glicosilación se predijeron con el servidor NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Los puntos isoeléctricos, pKs de residuos ionizables y la carga total a pH 7.5 y 5.5 de las fitasas recombinantes se estimaron con el servidor H++.²⁰

El sistema de numeración de los residuos de aminoácidos usado corresponde a la numeración de la fitasa de *B. amyloliquefaciens*, siendo el residuo número 1 la metionina del péptido señal. Debido a que todas las fitasas se produjeron como proteínas maduras, el primer residuo tiene el número 29.

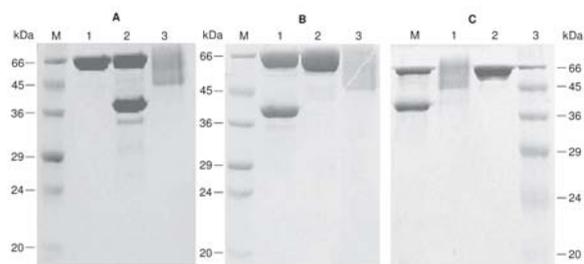


Fig. 1. Gels de SDS-poliacrilamida de las fitasas FTE (A), FTEII (B) y FBA (C) concentradas por ultrafiltración y tratadas con y sin Endo H_f . Carriles M: marcador de peso molecular. (A) Carriles: 1, Endo H_f ; 2, FTE tratada con Endo H_f ; 3, FTE sin tratamiento con Endo H_f . (B) Carriles: 1, FTEII tratada con Endo H_f ; 2, Endo H_f ; 3, FTEII sin tratamiento con Endo H_f . (C) Carriles: 1, FBA tratada con Endo H_f ; 2, FBA sin tratamiento con Endo H_f ; 3, Endo H_f .

Resultados

Diseño de secuencias aminoacídicas

La secuencia aminoacídica consenso calculada fue diferente a todas las 15 secuencias de fitasas; sin embargo, mostró un porcentaje de identidad mayor del 90% con diez de éstas. Esta secuencia aminoacídica consenso mostró 98% de identidad con la fitasa termoestable de *B. amyloliquefaciens*, diferenciándose sólo en siete aminoácidos. Un análisis comparativo de la estructura 2POO con el modelo por homología de la secuencia consenso mostró que de estos siete aminoácidos, tres podrían incrementar la estabilidad de la proteína (F29, V81, K292). Por otro lado, debido a que existe una discrepancia en la bibliografía acerca de la naturaleza del residuo 336 en las cinco estructuras tridimensionales descritas para la fitasa de *B. amyloliquefaciens* (1CVM, 1QLG, y 1H6L tienen N336, mientras que 1POO y 2POO tienen D336), y debido a que esta posición juega un papel importante en la interacción con un Ca^{2+} que estabiliza la estructura tridimensional de la proteína,²¹ se estudió la influencia de N336 o D336 en la termoestabilidad de ésta. Estas nuevas secuencias aminoacídicas diseñadas fueron lla-

madras FTE (N336) y FTEII (D336). Las secuencias de DNA se diseñaron y sintetizaron de tal forma que se produjeran las fitasas FTE, FTEII, y FBA como polipéptidos maduros de 355 aminoácidos.

Construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris*

El análisis por PCR del DNA genómico aislado a partir de las cepas KM71FTE, KM71FTEII, y KM71FBA mostró una banda de 1537 pb que corresponde al casete de expresión (1065 pb) y a un fragmento del promotor de *AOX1* (349 pb) y del terminador de la transcripción (123 pb). Estos resultados indican la ausencia del gen *AOX1*, y la correcta integración del casete de expresión en el genoma de *P. pastoris*, confirmando el fenotipo Mut⁺.

Producción de las fitasas recombinantes

Los medios de cultivo libre de células de los cultivos para la selección de las cepas sobreproductoras mostraron una actividad volumétrica de fitasa entre 0.12 a 4.97 U/mL (0.39 a 10.74 nU/célula) para las cepas KM71FTE y KM71FTEII, y 0.28 a 3.39 U/mL (0.80 a 8.57 nU/célula) para las cepas KM71FBA, mientras que las cepas sobreproductoras KM71PhyC y GS115PhyC mostraron una actividad volumétrica de fitasa de 0.27 y 0.82 U/mL (0.70 y 5.30 nU/célula), respectivamente. Por lo tanto, la cepa sobreproductora KM71FTEII generó una producción de fitasa extracelular por célula 15.3 y 6.9 veces más alta que la generada por las cepas sobreproductoras KM71PhyC y GS115PhyC, respectivamente. De manera similar, la cepa sobreproductora KM71FBA generó una producción de fitasa extracelular por célula 12.2 y 5.5 veces más alta, en comparación con las cepas sobreproductoras KM71PhyC y GS115PhyC, respectivamente. La fitasa C de *B. subtilis* tiene un porcentaje de identidad de 93.2 y 92.6% con FTEII y FBA, respectivamente, pero el gen *phy C* en nuestras cepas recombinantes

construidas tiene codones nativos,¹⁶ mientras que los genes *fteII* y *fba* tienen codones preferenciales de *P. pastoris*. Por lo tanto, la alta producción de fitasa extracelular por célula de las cepas sobreproductoras KM71FTEII y KM71FBA probablemente se debió al uso de codones preferenciales de *P. pastoris* en los genes *fteII* y *fba*.

La cepa sobreproductora KM71FTEII generó una producción de fitasa extracelular por célula de 1.25 veces más alta que la correspondiente de la cepa sobreproductora KM71FBA. Es probable que este resultado se deba a la presencia de una fenilalanina en FTEII como el primer residuo de la secuencia madura, mientras FBA tiene una lisina en esa posición, mejorando así el procesa-

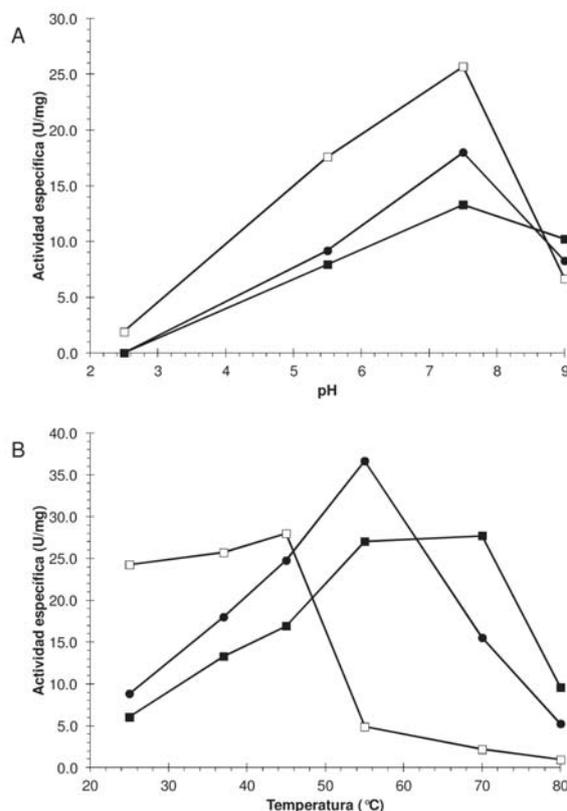


Fig. 2. Efecto del pH (A) y la temperatura (B) en la actividad específica a 37°C y pH 7.5, respectivamente, para las fitasas FTE (□), FTEII (■) y FBA (●). Los puntos representan la media de al menos tres ensayos independientes (coeficientes de variación <5%).

miento del péptido prepro de secreción por la endopeptidasa Kex2.

Caracterización bioquímica de las fitasas

La figura 1 muestra el cambio en la movilidad electroforética en geles de SDS-poliacrilamida para las fitasas recombinantes después de tratamiento con la enzima Endo H_f. Las tres fitasas (FTE, FTEII, y FBA) sin tratamiento con Endo H_f mostraron un barrido en el gel de SDS-poliacrilamida en un intervalo entre 45 a 66 kDa (figura 1A, carril 3; 1B, carril 3; y 1C, carril 2). Después de la N-desglicosilación con EndoH_f, las tres fitasas mostraron un peso molecular aparente de 39 kDa (figura 1A, carril 2; 1B, carril 1; y 1C, carril 1). Estos resultados indican que las tres fitasas fueron altamente N-glicosiladas. Estas fitasas tienen cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (121NRSE, 281NSSY, 138NGTL, y 243NGTV), siendo los últimos dos los de mayor probabilidad de ser N-glicosilados, ya que se encuentran en la superficie de la proteína.

La secuencia aminoterminal de la banda de 39 kDa resultó ser FLSDPYHFTV para FTE y FTEII, y KLSDPYHFTV para FBA. Estas secuencias, idénticas a las secuencias teóricas, demuestran la identidad de las fitasas y el correcto procesamiento de la secuencia prepro de secreción.

La actividad específica de las fitasas purificadas fue 25.7, 13.3, y 18.0 U/mg para las fitasas FTE, FTEII, y FBA, respectivamente.

Las tres fitasas tuvieron un pH óptimo de actividad de 7.5 (figura 2A). A pH 7.5, la FTE mostró una actividad específica más alta que la de la FTEII o FBA, mientras que a pH 9.0, FTEII tuvo la mayor actividad específica. Aunque las tres fitasas recombinantes tuvieron un perfil de actividad con respecto al pH similar, el efecto de la temperatura en la actividad específica fue diferente (figura 2B). La temperatura óptima fue de 45°C para la FTE y 55°C para FBA, mientras que FTEII mostró un intervalo amplio de máxima actividad (55 a 70°C). FBA mostró la actividad específica más

alta a 55°C; sin embargo, FTEII tuvo la mayor actividad específica a 70°C.

Las actividades residuales de todas las fitasas aumentaron cuando el ensayo se realizó en presencia de 5 mM CaCl₂ (figura 3), éste es un comportamiento típico de las fitasas del género *Bacillus*.^{2,3} FTEII y FBA mostraron la termoestabilidad más alta a pH 7.5 y 5 mM CaCl₂, seguida de PhyC-R y FTE (figura 3B), sin diferencias estadísticamente significativas entre cada par de fitasas. Sin embargo, las cuatro fitasas recombinantes mostraron una alta termoestabilidad a pH 5.5 (figura 3C, D), excepto PhyC-R que disminuyó rápidamente su actividad residual en presencia de 1 mM CaCl₂ (figura 3C).

Análisis computacional de los modelos moleculares

De entre los factores estructurales analizados con los 28 residuos en los que se diferencia PhyC de FBA, las diferencias en los enlaces de hidrógeno y los puentes salinos, y la presencia de una prolina en un bucle de superficie podrían explicar las diferencias en la termoestabilidad observadas a pH 7.5 y 5 mM CaCl₂ entre FTEII, FBA, y PhyC-R, mientras que la presencia de N336 en FTE explicaría su reducida termoestabilidad a pH 7.5.

Discusión

Recientemente, nuestro grupo de trabajo produjo la fitasa C de *B. subtilis* VTTE-68013 (PhyC-R), al emplear el sistema de expresión de *P. pastoris*.^{15,16} Con el objetivo de mejorar la termoestabilidad de esta fitasa, decidimos diseñar nuevas fitasas termoestables con actividad catalítica a pH neutro (FTE y FTEII) a partir de fitasas del género *Bacillus*. Aprovechando la experiencia de nuestro grupo de trabajo en la producción de proteínas recombinantes al emplear el sistema de expresión de *P. pastoris*,^{13,16} decidimos además producir las nuevas fitasas recombinantes en dicho sistema de expresión con un gen sintético

tes porcentajes de glicosilación entre las fitasas recombinantes que cambiarían sus pesos moleculares.

En el presente trabajo, además de producir una fitasa termoestable con actividad a pH 7.5 y 5.5 que servirá para futuras aplicaciones biotecnológicas, se contribuye al entendimiento de los mecanismos involucrados en la termoestabilidad de enzimas de interés comercial. Los análisis estructurales (figura 4) sugieren que la mayor termoestabilidad de FTEII y FBA, con respecto a PhyC-R, podría deberse a un mayor número de puentes de hidrógeno en FTEII y FBA, especialmente el puente de H formado entre la T37 y la K361 que une el noveno residuo del extremo amino-terminal con una hélice alfa de la proteína (figura

4B). Adicionalmente, la presencia de P257 que se encuentra en un bucle de superficie (figura 4C) que no perturba la estructura tridimensional pudiera incrementar la estabilidad de FTEII y FBA, tal como se ha propuesto en la bibliografía para otras proteínas.^{23,24} Además, recientemente se ha descrito una fitasa de *B. subtilis* US417 altamente termoestable²⁵ cuya secuencia aminoacídica sólo se diferencia con la PhyC de *B. subtilis* VTTE-68013 en la posición 257 (P versus R, respectivamente) que confirma el efecto estabilizante de P257 en las fitasas del género *Bacillus*. Por otro lado, el análisis estructural mostró que la menor termoestabilidad de la fitasa FTE a pH 7.5, comparada con las demás fitasas, se debió a la sustitución D336N en su secuencia

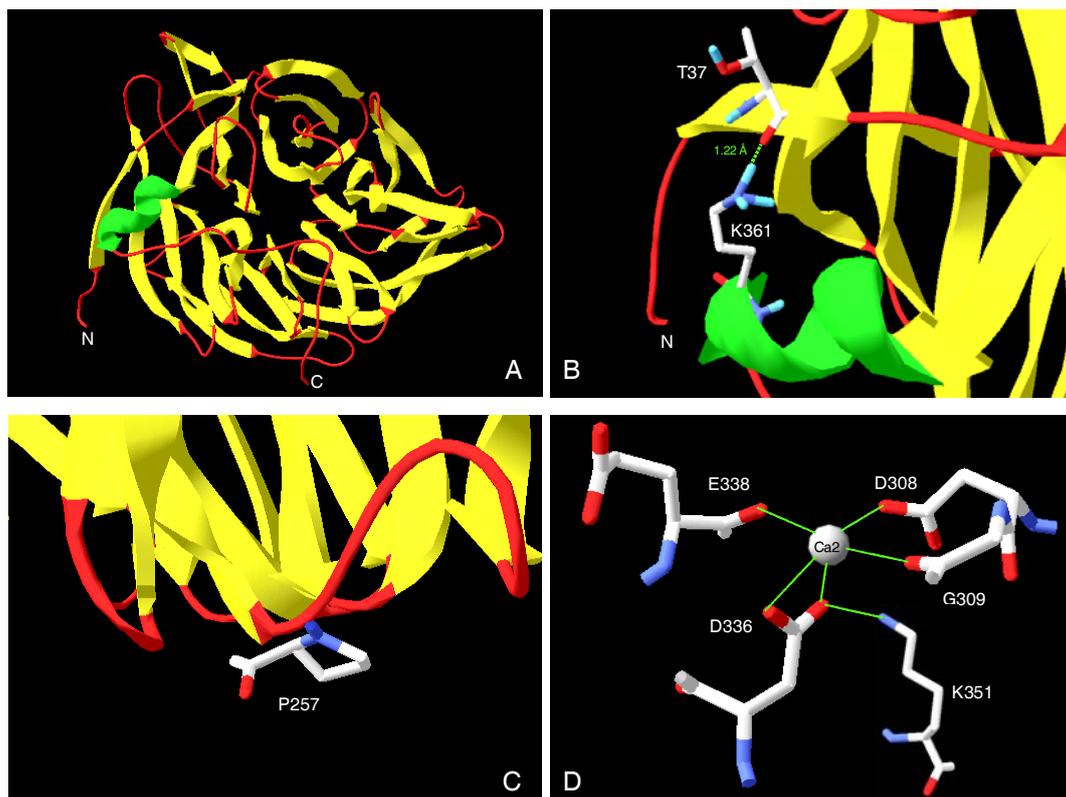


Fig.4. Modelo molecular de FTEII (A) construido por modelaje por homología con SWISS-MODEL 8.05 y la estructura 2POO como templado. Enlace de hidrógeno entre T37 and K361 (B) en la estructura de FTE, FTEII, y FBA, que une el noveno residuo desde el extremo amino-terminal con la hélice alfa de la proteína. P257 en un bucle de superficie (C) en FTE, FTEII, y FBA. Puente salino entre D336 y un catión Ca^{2+} o K351 (D) en FTEII, FBA, y PhyC. También se muestran otros puentes salinos con el catión Ca^{2+} .

aminoacídica, eliminándose tres puentes salinos de D336: dos con uno de los cationes Ca^{2+} involucrados en la estabilidad de la enzima²¹ y un puente salino con la K351 (figura 4D).

Se observó un diferente comportamiento en la termoestabilidad a pH 5.5 que a 7.5 para las cuatro fitasas (figura 3) siendo todas las fitasas más termoestables a pH 5.5 que a pH 7.5. Esta diferencia probablemente se debe a una carga total diferente a pH 5.5 que a 7.5, ya que el punto isoeléctrico de la PhyC nativa es 6.5² y el valor estimado para la FTE, FTEII y FBA fue 6.66, 6.59 y 6.65.

Teniendo en cuenta las curvas de actividad con respecto al pH, las fitasas con estructura de hélice diseñadas son más apropiadas que las fitasas de *Aspergillus* y *E. coli* para emplearse como aditivo de alimentos de animales con tractos digestivos neutros-básicos, tal como especies de acuicultura agástricas (camarones y varios peces), ya que estas enzimas tienen un pH óptimo de actividad cerca de la neutralidad y el pH de los sistemas digestivos de las especies de acuicultura agástricas está cercano a siete. Además, estas fitasas son muy estables a las altas temperaturas de los procesos de peletizado de los alimentos de animales. Las fitasas con estructura de hélice diseñadas pueden también ser usados en el procesado de alimentos industriales en condiciones suaves (pH neutro y baja temperatura) para la hidrólisis de fitatos.

Resumen

Se diseñaron fitasas con estructura de hélice con una estrategia de secuencia consenso guiada por estructura. Se modificaron genéticamente cepas de *Pichia pastoris* para sobreproducir dichas enzimas. Las fitasas recombinantes mostraron actividad en un intervalo de pH de 2.5 a 9.0, y una alta actividad residual después de 10 min de tratamiento a 80°C y pH 5.5 o 7.5. Estas fitasas con estructura de hélice son más apropiadas que las fitasas de *Aspergillus* y *E. coli* para emplearse como

aditivo de alimentos de animales con tractos digestivos neutros-básicos, tal como especies de acuicultura agástricas (camarones y varios peces).

Palabras clave: Fitasas con estructura de hélice, Termoestabilidad, *Pichia pastoris*.

Abstract

We designed new beta-propeller phytases, using a structure-guided consensus approach, and engineered *Pichia pastoris* strains to overproduce the enzymes. The recombinant phytases showed activity over a pH range of 2.5 to 9.0, and a high residual activity after 10 min of heat treatment at 80°C and pH 5.5 or 7.5. The designed beta-propeller phytases are more suitable than the *Aspergillus* and *E. coli* phytases as feed additives for animals with neutral-basic digestive tracts, such as agastric aquaculture species (shrimp and several fishes).

Keywords: Beta-propeller Phytases, Thermostability, *Pichia pastoris*.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo económico por parte de Conacyt-Sagarpa (2003-02-141) y Paicyt-UANL (Clave CN031-09), y el apoyo técnico brindado por el Q.B.P. Miguel Castillo-Galván, Dr. J. Gerardo Carreón Treviño, L.C.A. Luis A. Castillo Ramírez y el Dr. Arturo Rojo Domínguez. JAGL agradece la beca del Conacyt.

Referencias

1. Lei, X.G., J.M. Porres, E.J. Mullaney, H. Brinch-Pedersen. 2007. Phytase: source, structure and application, p. 505-529. In J. Polaina, A.P. MacCabe (ed.), Industrial enzymes: Structure, function and applications. Springer, Dordrecht.
2. Kerovu, J., M. Lauraeus, P. Nurminen, N.

- Kalkkinen, J. Apajalahti. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2079-2085.
3. Kim, Y.O., H.K. Kim, K.S. Bae, J.H. Yu, T.K. Oh. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Technol.* 22:2-7.
 4. Vázquez-Figueroa, E., J. Chaparro-Riggers, A.S. Bommarius. 2007. Development of a thermostable glucose dehydrogenase by a structure-guided consensus concept. *Chembiochem.* 8:2295-2301.
 5. Ilgen, C., J. Lin-Cereghino, J.M. Cregg. 2004. *Pichia pastoris*, p. 143-162. In G. Gellissen (ed.), *Production of recombinant proteins - Novel microbial and eukaryotic expression systems*. Wiley-VCH, Weinheim.
 6. Lehmann, M., C. Loch, A. Middendorf, D. Studer, S.F. Lassen, L. Pasamontes, A.P. van Loon, M. Wyss. 2002. The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. *Protein Eng.* 15:403-411.
 7. Lehmann, M., D. Kostrewa, M. Wyss, R. Brugger, A. D'Arcy, L. Pasamontes, A.P. van Loon. 2000. From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. *Protein Eng.* 13:49-57.
 8. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
 9. Invitrogen. 2009. *Pichia* expression kit for expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf.
 10. Ortmann, D., M. Ohuchi, H. Angliker, E. Shaw, W. Garten, H.D. Klenk. 1994. Proteolytic cleavage of wild type and mutants of the F protein of human parainfluenza virus type 3 by two subtilisin-like endoproteases, furin and Kex2. *J. Virol.* 68:2772-2776.
 11. Rawlings, N.D., F.R. Morton, C.Y. Kok, J. Kong, A.J. Barrett. 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 36:D320-325.
 12. Sreekrishna, K. 1993. Strategies for optimizing protein expression and secretion in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, p. 119-126. In R. H. Baltz, G. D. Hegeman, P.L. Skatrud (ed.), *Industrial microorganisms: basic and applied molecular genetics*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
 13. Ecamilla-Treviño, L.L., J.M. Viader-Salvadó, H.A. Barrera-Saldaña, M. Guerrero-Olazarán. 2000. Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 22:109-114.
 14. Byrne, L.J., K.J. O'Callaghan, and M.F. Tuite. 2005. Heterologous gene expression in yeast, p. 51-64. In C. M. Smales, D. C. James (ed.), *Methods in molecular biology*. vol. 308. *Therapeutic proteins: methods and protocols*, Humana Press Inc, Totowa, NJ.
 15. Guerrero-Olazarán, M., L. Rodríguez-Blanco, J.G. Carreón-Treviño, J.A. Gallegos-López, M. Castillo-Galván, J.M. Viader-Salvadó. 2007. Bacterial phytase produced in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 131:S233-S234.
 16. Guerrero-Olazarán, M., L. Rodríguez-Blanco, J.G. Carreón-Treviño, J.A. Gallegos-López, M. Castillo-Galván, J.M. Viader-Salvadó. 2010. Expression of *Bacillus* phytase C gene in *Pichia pastoris* and properties of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(16): 5601-5608.
 17. Guex, N., M.C. Peitsch. 1997. SWISS-MODEL the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723.
 18. Diemand, A.V., H. Scheib. 2004. iMolTalk: an interactive, internet-based protein structure analysis server. *Nucleic Acids Res.* 32:W512-W516.
 19. Schwede, T., J. Kopp, N. Guex, M.C. Peitsch.

2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31:3381-3385.
20. Gordon, J.C., J.B. Myers, T. Folta, V. Shoja, L.S. Heath, A. Onufriev. 2005. H⁺⁺: a server for estimating pK_as and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Res.* 33:W368-W371.
21. Ha, N.C., B.C. Oh, S. Shin, H.J. Kim, T.K. Oh, Y.O. Kim, K.Y. Choi, B.H. Oh. 2000. Crystal structures of a novel thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. *Nat. Struct. Biol.* 7:147-153.
22. Shin, S., N.C. Ha, B.C. Oh, T.K. Oh, B.H. Oh. 2001. Enzyme mechanism and catalytic property of beta propeller phytase. *Structure* 9:851-858.
23. Choi, E.J., and S.L. Mayo. 2006. Generation and analysis of proline mutants in protein G. *Protein Eng. Des. Sel.* 19:285-289.
24. Barzegar, A., A.A. Moosavi-Movahedi, J.Z. Pedersen, M. Miroliaei. 2009. Comparative thermostability of mesophilic and thermophilic alcohol dehydrogenases: Stability-determining roles of proline residues and loop conformations. *Enzyme Microb. Technol.* 45:73-79.
25. Farhat, A., H. Chouayekh, M.B. Farhat, K. Bouchaala, S. Bejar. 2008. Gene cloning and characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 and assessment of its potential as a feed additive in comparison with a commercial enzyme. *Mol. Biotechnol.* 40:127-135.

Recibido: 1 de septiembre de 2011

Aceptado: 1 de octubre de 2011