

**TESI DOCTORAL**  
**UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA**

**Estudio de la producción heteróloga de una  
lipasa del hongo *Rhizopus oryzae* en la levadura  
metilotrófica *Pichia pastoris***

**Alicia Serrano González**

FRANCISCO VALERO BARRANCO, Profesor titular del *Departament d'Enginyeria Química* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* y

PAU FERRER / ALEGRE, Investigador del *Departament d'Enginyeria Química* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*

**CERTIFICAN:**

Que la licenciada Alicia Serrano González ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo que, con título "**Estudio de la producción heteróloga de una lipasa del hongo *Rhizopus oryzae* en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris***", presenta en esta memoria, la cual constituye su Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que conste a los efectos que corresponda, presentamos a la *Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona* el trabajo citado, firmando el presente certificado en Bellaterra, a 30 de Noviembre del 2001.

Francisco Valero Barranco

Pau Ferrer i Alegre

<b>A. PRESENTACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA MEMORIA</b>	<b>1</b>
<b>B. RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>C. INTRODUCCIÓN GENERAL.</b>	<b>5</b>
<b>1 Las levaduras metilotróficas.</b>	<b>5</b>
1.1 Origen del interés por las levaduras metilotróficas: <i>Single cell protein (SCP)</i> .	5
1.2 Aplicaciones de las levaduras metilotróficas.	7
1.3 Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas.	8
1.3.1 Metabolismo energético en levaduras metilotróficas.	9
1.3.2 Vía de asimilación del C en levaduras metilotróficas.	12
<b>2 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión de proteínas heterólogas.</b>	<b>13</b>
2.1 ¿Por qué <i>Pichia pastoris</i> ?	13
2.2 Promotor de la AOX1 en <i>P. pastoris</i> : Aspectos generales de su regulación.	14
2.3 Vectores de expresión, fenotipo Mut (Methanol utilisation) y cepas comerciales de <i>P. pastoris</i>	16
2.3.1 Vectores de expresión en <i>P. pastoris</i> .	16
2.3.2 Fenotipo Mut y cepas comerciales de <i>P. pastoris</i> .	18
2.4 Expresión de proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i> bajo el P <sub>AOX1</sub> .	19
<b>3 Cultivos de producción de proteínas heterólogas a elevada densidad celular bajo el P<sub>AOX1</sub> en <i>P. pastoris</i>.</b>	<b>20</b>
3.1 Aspectos generales del cultivo de <i>P. pastoris</i> en metanol.	20
3.2 Proteínas expresadas en <i>P. pastoris</i> .	22
<b>4 Lipasas, estructura, función e interés biotecnológico.</b>	<b>24</b>
4.1 Enzimas lipolíticos. Estructura, función y aplicaciones.	24
4.2 Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> (ROL).	24
<b>D. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.</b>	<b>27</b>
<b>E. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
<b><u>CAPÍTULO 1. Estudio de estrategias operacionales en fed-batch para la producción de una lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> (ROL) expresada en <i>P. pastoris</i>. Efecto de la expresión heteróloga de la lipasa sobre el crecimiento celular.</u></b>	
1.1 Introducción.	29
1.2 Materiales y Métodos.	30

1.3 Resultados y Discusión.	36
1.3.1 Producción de la ROL en <i>P. pastoris</i> : determinación del fenotipo Mut y cultivo en medio de cultivo sintético: CULTIVO A.	36
1.3.2 Seguimiento de la concentración de metanol en la etapa de producción por cromatografía de gases: CULTIVO B.	41
1.3.3 Estrategia de adición de sustratos mixtos glicerol-metanol: CULTIVO C.	44
1.3.4 Efecto de la expresión de la lipasa sobre el crecimiento celular y el consumo de metanol: CULTIVO D.	48
1.3.5 Efecto del medio de cultivo sobre el rendimiento de recuperación de la ROL recombinante.	50
1.4 Conclusiones.	52

**CAPÍTULO 2. Efecto del aumento de la dosis génica heteróloga y del fenotipo celular Mut<sup>+/s</sup> en la expresión de una lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) en *Pichia pastoris*.**

2.1 Introducción.	55
2.2 Materiales y Métodos.	57
2.3 Resultados y Discusión.	62
2.3.1 Generación de cepas ROL multicopia Mut <sup>+</sup> y comprobación de la dosis génica	62
2.3.2 Cultivo de la cepa GSR500_3 en <i>fed-batch</i> : CULTIVO E.	65
2.3.3 Reversión de la autotrofia his <sup>-</sup> de la cepa GSR500_3.	71
2.3.4 Cultivos de la cepa X-33/500_3 en <i>fed-batch</i> .	72
2.3.5 Efecto del fenotipo celular Mut en la producción de la ROL recombinante en <i>P. pastoris</i> .	73
2.4 Conclusiones.	74

**CAPÍTULO 3. Promotores de expresión alternativos al P<sub>AOX1</sub> para la producción de una lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) en *P. pastoris*: expresión constitutiva (P<sub>GAP</sub>) e inducción por fuente de nitrógeno (P<sub>FLD1</sub>).**

3.1 Introducción.	77
3.2 Materiales y Métodos.	78
3.3 Resultados y Discusión.	83
3.3.1 Expresión constitutiva de la ROL (pGAPZ $\alpha$ A-ROL).	83
3.3.2 Expresión de la ROL inducida por fuente de nitrógeno.	84
3.3.2.1 Construcción del vector pPICFLD $\alpha$ -ROL.	84
3.3.2.2 Cultivos en erlenmeyer de la cepa X-33/FLDROL2_1.	88
3.4 Conclusiones.	89

**CAPÍTULO 4. Obtención de una lipasa de *Rhizous oryzae* recombinante: generación de la proteína de fusión MBP-ROL y purificación por cromatografía.**

4.1	Introducción.	91
4.2	Materiales y Métodos.	93
4.3	Resultados y Discusión.	98
4.3.1	Generación de la proteína de fusión MBP-ROL y purificación por cromatografía de afinidad.	98
4.3.2	Recuperación y purificación de la ROL recombinante.	101
4.4	Conclusiones.	104
<b>F.</b>	<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GLOBALES.</b>	107
<b>G.</b>	<b>REFERENCIAS.</b>	113



### A. PRESENTACIÓN.

---

El siguiente trabajo se ha realizado en el *Departament d' Enginyeria Química* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB), dentro del programa de doctorado correspondiente al área de Biotecnología. El trabajo aquí presentado contribuye, y queda incluido, en el desarrollo del Proyecto Europeo asignado al mismo centro, perteneciente al *IV Framework Program (Cell Factory-Biotechnology. BIO4-CT96-0005)*, que lleva por título: "*Microbial production of native and recombinant tailor-made enzymes for fine chemicals production*" (Coordinador: Dr. C. Solà. Universitat Autònoma de Barcelona).

En concreto, esta memoria recoge los primeros resultados obtenidos en el estudio de la producción recombinante de una enzima lipolítica (una lipasa del hongo *Rhizopus oryzae*, ROL) expresada en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, explorando una serie de estrategias para la optimización de la producción de proteínas recombinantes en este microorganismo.

Así pues, bajo un punto de vista biotecnológico, en este trabajo se ha realizado un esfuerzo en integrar estrategias y conceptos propios de la ingeniería bioquímica (como la mejora de las condiciones de operación de un cultivo en *fed-batch*) con herramientas de biología molecular, con el objetivo común de optimizar la producción final de la proteína de interés. De esta forma, además, se ha contribuido a dar una primera visión global y multidisciplinar del desarrollo del proceso de producción y a establecer algunas de las futuras líneas de investigación a seguir en trabajos posteriores, dentro de los diferentes campos de la ingeniería bioquímica y la biología molecular.

### ESTRUCTURA DE LA MEMORIA

---

Este trabajo contiene, en primer lugar, un apartado de **Introducción General**, donde se describe el sistema de expresión de proteínas de *P. pastoris*, remarcando algunos de los aspectos más importantes de su metabolismo y cuestiones de carácter general que facilitarán el seguimiento y la lectura de la memoria.

## **A. PRESENTACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA MEMORIA**

---

A continuación, los resultados experimentales obtenidos se presentan agrupados en **cuatro capítulos** distintos, dentro del apartado de **Resultados y Discusión**. Cada capítulo está estructurado, a su vez, por una breve introducción específica al tema estudiado, los resultados obtenidos, así como la discusión de los mismos, acabando con las conclusiones a las que se ha llegado.

En último lugar, se incluye un capítulo de **Discusión y Conclusiones Globales**, en el que se discute y se concluye íntegramente toda la información contenida en los capítulos anteriores.



**B. RESUMEN.**

---

Este trabajo recoge los resultados obtenidos en el estudio de la producción extracelular de una lipasa del hongo *Rhizopus oryzae* (ROL) expresada en la levadura metilotrófica *P. pastoris*. El sistema de expresión de la ROL en esta levadura depende de la utilización del metanol como sustrato inductor. Los niveles de productividad alcanzados en el cultivo en *fed-batch* de esta cepa se han incrementado, hasta en un factor de 13.6, mediante el estudio de la estrategia de adición del metanol durante la etapa de inducción. Asimismo, estos cultivos se han realizado utilizando un medio de cultivo sintético, mucho más económico que el de composición compleja. Igualmente, se han creado cepas de *P. pastoris* ROL multicopia, isogénicas a la original de una única copia del gen *ROL*, para la optimización de la producción.

Por otro lado, se ha llevado a cabo el estudio de la expresión de la ROL mediante vectores de expresión basados en la utilización de promotores no inducibles por el metanol. Se han obtenido cepas de *P. pastoris* que expresan la ROL de forma constitutiva, o por inducción mediante la fuente de nitrógeno utilizada para el crecimiento. Las cepas desarrolladas con estos vectores permiten prescindir de la utilización del metanol como sustrato inductor, y en el caso de la expresión constitutiva de la ROL, además, evaluar el efecto de la expresión de la lipasa sobre la cepa hospedadora.

Por último, se ha desarrollado un protocolo para la recuperación de la ROL desde el caldo de cultivo hasta la obtención de un producto liofilizado de la proteína. Asimismo, se ha llevado a cabo el proceso de purificación y obtención de la ROL recombinante con un grado de pureza y rendimiento satisfactorio para la utilización de la lipasa en reacciones enzimáticas, así como para la generación de anticuerpos contra esta proteína, lo cual permitirá subsecuentes estudios de caracterización de la misma.



C. INTRODUCCIÓN GENERAL

---

1. **LAS LEVADURAS METILOTRÓFICAS.**

Koichi Ogata describió en 1969 la capacidad de ciertas levaduras de utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía. A diferencia de lo observado en las bacterias metilotróficas, cuya existencia se conocía desde el siglo XIX, el número de géneros de levaduras metilotróficas descritos es muy limitado. El aislamiento de este tipo de levaduras desde su hábitat natural requirió procesos de enriquecimiento bajo condiciones óptimas, medios de cultivo adecuados que contenían sustancias antibacterianas como la penicilina o la cicloserina, y un pH de cultivo bajo (3-5). En concreto, existen cuatro únicos géneros de levaduras metilotróficas: *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* y *Candida* (Tani *et al.*, 1978). Además, estos cuatro géneros están muy relacionados entre sí. Los estudios de Lee *et al.*, (1980), mostraron, a partir del análisis de su contenido G-C y demás características fisiológicas, que los ascomicetes *Hansenula* y *Pichia* están taxonómicamente muy próximos, y sugieren que los asporógenos, *Torulopsis* y *Candida*, no son más que formas imperfectas de aquéllas dos.

1.1 **Origen del interés por las levaduras metilotróficas: *Single Cell protein (SCP)*.**

A lo largo del siglo XX, el progreso de la tecnología de procesos y la microbiología permitió el desarrollo de procesos encaminados al beneficio directo de las levaduras, es decir, aprovechar directamente su biomasa.

Así surgió, en los años cincuenta, la idea de utilizar las levaduras como fuentes de proteína (*single-cell protein, SCP*). Durante años, se realizaron diversos trabajos de investigación dirigidos al uso de estos microorganismos como fuente de alimento utilizable como alternativa, o complemento, de los piensos para el consumo animal, con el principal propósito de contribuir de esta forma a abaratar el coste final de la carne. Además, para asegurar la rentabilidad del proceso global, la tecnología de la *SCP* se desarrolló en relación con el aprovechamiento y reutilización de productos residuales generados usualmente en procesos industriales. Uno de estos subproductos, generado en gran cantidad era el metano, del cual se obtenía el metanol, substrato soluble y barato.

El descubrimiento de las levaduras metilotróficas (Ogata *et al.*, 1969) fue de especial interés para la tecnología de la *SCP*, debido a que poseen características más favorables para este proceso que las

### **C. INTRODUCCIÓN GENERAL**

---

bacterias metilotróficas. Las células de levadura tienen un tamaño mayor, lo que facilita su recuperación, un menor contenido en ácidos nucleicos, son ricas en vitaminas, lípidos, carbohidratos y en aminoácidos esenciales como la lisina, el triptófano o la metionina. Además, poseen un pH óptimo de crecimiento bajo (3-5), lo cual dificulta la posible contaminación del cultivo. Básicamente, las levaduras metilotróficas eran fisiológicamente más aceptables para el consumo animal que la SCP de origen bacteriano.

Posiblemente, el trabajo de mayor logro alcanzado en este contexto fue el realizado por la compañía de petróleo *Phillips Petroleum* con la levadura metilotrófica *P. pastoris*. Los científicos de esta compañía investigaron y definieron medios y protocolos adecuados para el cultivo de esta levadura metilotrófica a partir del metanol (*Phillips Petroleum Company Licesing*, 1986).

*Phillips Petroleum*, junto con su empresa subsidiaria *Provesta*, determinaron no tan sólo los requerimientos nutricionales y operativos del proceso de crecimiento de *P. pastoris*, sino que diseñaron la configuración necesaria de los bioreactores utilizados para su cultivo, de forma que se asegurara una transferencia de oxígeno adecuada a elevadas densidades celulares (*Wegner et al.*, 1983). El producto final, denominado *Proveesten*, unos 120-150 g de peso seco de biomasa por litro de cultivo (hasta 25000 litros de volumen), se componía en un 60% de contenido proteico y, en una proporción adecuada, de aquellos nutrientes esenciales requeridos en la dieta animal. Su valor nutricional y seguridad se comprobaron en ensayos donde se utilizaron como fuente de pienso animal (*Harder et al.*, 1987).

Sin embargo, la posterior crisis económica del petróleo causó un aumento en el coste del metano, y por lo tanto, la producción de SCP a partir del metanol dejó de ser económicamente rentable. El precio de la principal alternativa en piensos para animales, las harinas de origen vegetal (como por ejemplo la harina de soja), decayó drásticamente. Consiguientemente, ya en la década de los noventa, la *Phillips Petroleum Company* contactó con el *Salk Institute of Biotechnology/Industrial Associates, Inc.* (*SIBIA*, La Jolla, CA, EUA) para realizar estudios de tipo biológico en *P. pastoris*, y evaluar la posibilidad de desarrollar un sistema de expresión de proteínas heterólogas en este microorganismo. Estos estudios, junto con los conocimientos operacionales de cultivo que se poseían, permitiría la utilización de este sistema de expresión en procesos de producción de proteínas heterólogas de elevado interés humano e industrial.

Los investigadores del *SIBIA* aislaron genes y promotores eficaces para la expresión de proteínas foráneas en *P. pastoris*, y construyeron vectores, cepas, y protocolos de manipulación genética en este microorganismo. En el año 1993, *Phillips Petroleum* cedió la patente sobre *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas heterólogas a la *Research Corporation Technologies, RCT* (Tucson, AZ), y licenció a la compañía *Invitrogen Corporation* a comercializar con los componentes del sistema. (*Lin Cereghino and Cregg*, 2000).

## 1.2 Aplicaciones de las levaduras metilotróficas

Al margen de la comercialización de la tecnología de cultivo desarrollada para la producción de SCP a partir de levaduras metilotróficas, existen otras aplicaciones derivadas de las características particulares de estos microorganismos. Fundamentalmente, éstas son: la obtención de productos de química fina, el desarrollo de un sistema de expresión de proteínas heterólogas eucariota, así como su utilización como herramientas de estudio en diferentes líneas de investigación básica.

Algunos de los trabajos de investigación aplicada con estos microorganismos son, por ejemplo, la obtención de diferentes aminoácidos a partir de las levaduras metilotróficas, descrito ya en los años setenta. Okumura *et al.*, (1970), patentaron varios de estos procesos, en los que se describen niveles de producción de aminoácidos entre los 0.5 g l<sup>-1</sup> de L-valina, L-treonina o L-lisina y los 1.5 g l<sup>-1</sup> de L-ácido glutámico.

Patel *et al.*, (1981), demostraron que suspensiones celulares de *H. polymorpha*, *C. boidinii*, *Pichia* sp y *Torulopsis* sp., crecidas en metanol, poseían la habilidad de oxidar alcoholes secundarios a sus correspondientes metilcetonas. Además, se descubrió en *Pichia* sp. una alcohol deshidrogenasa secundaria asociada a NAD<sup>+</sup>. Esta enzima es capaz de catalizar la oxidación de alcoholes secundarios en presencia de NAD<sup>+</sup> y reducir las metilcetonas en presencia de NADH de forma específica, sin afectar a los alcoholes primarios.

Otro de los ejemplos a mencionar es la producción de aquellos enzimas y metabolitos asociados al proceso de asimilación del metanol, como la enzima alcohol oxidasa. Esta enzima cataliza la primera reacción de la oxidación del metanol en *P. pastoris* y se llega a generar hasta en un 30% de la proteína soluble total, en presencia de concentraciones limitantes de metanol (Cregg *et al.*, 1987). La alcohol oxidasa se utiliza en procesos de diagnóstico de determinación de niveles de alcohol, principalmente. También se utiliza como aditivo de detergentes y lejías, debido a que de su reacción libera peróxido de hidrógeno (Unilever, 1987).

Más recientemente, se ha descrito la producción de otras biomoléculas como el glicerol y diversos aldehidos y polioles (sorbitol, iditol y xilitol) a partir de cepas de la levadura metilotrófica *C. boindii* (Tani *et al.*, 1990).

Sin embargo, la principal aplicación de las levaduras metilotróficas, o al menos la más importante en el ámbito biotecnológico, fue el descubrimiento de su excelente capacidad para actuar como células hospedadoras de proteínas heterólogas. Los géneros de *Pichia* y *Hansenula* representan una alternativa interesante y ventajosa frente a sistemas convencionales de expresión de proteínas foráneas, como *Escherichia coli* o la comúnmente conocida levadura del pan, *Sacharomyces cerevisiae*. Las principales ventajas que ofrece *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas heterólogas se describen en la sección 2.1 de este mismo capítulo.

Por otro lado, a lo largo de los últimos años se han abierto diferentes líneas de investigación científica asociadas al estudio de aspectos concretos de esta levadura. Algunos ejemplos son: la caracterización a nivel molecular del proceso de compartimentalización celular inducido en estos microorganismos en presencia del metanol (biogénesis de los peroxisomas), así como el estudio de la regulación de la expresión asociada al metabolismo del metanol, entre otros.

El sistema de expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* está principalmente basado en la utilización del promotor de la enzima alcohol oxidasa,  $P_{AOX1}$ , que está fuertemente regulado e inducido por el metanol. Por esta razón, es muy importante el conocimiento de algunos de los aspectos generales del metabolismo de este substrato en levaduras.

### **1.3 Metabolismo del metanol en las levaduras metilotróficas.**

La oxidación completa del metanol a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en microorganismos metilotróficos engloba tanto vías disimilatorias (de generación de energía), como vías asimilatorias (de biosíntesis de material celular). Sin embargo, este metabolismo en las levaduras metilotróficas difiere, respecto al de las bacterias metilotróficas, en tres aspectos principales:

- La naturaleza de las enzimas involucradas: Para la oxidación inicial del metanol las levaduras no poseen metanol deshidrogenasas sino alcohol oxidasas.
- La compartimentalización del proceso: En las levaduras, parte de la oxidación del metanol ocurre dentro de orgánulos celulares denominados peroxisomas. Estos compartimentos membranosos albergan algunas de las enzimas y metabolitos involucrados en el proceso de oxidación del metanol, como por ejemplo la alcohol oxidasa y la catalasa. Durante el crecimiento en presencia de metanol, los peroxisomas pueden llegar a ocupar el 90% del volumen celular, mientras que en presencia de otras fuentes de carbono, como la glucosa o el glicerol, son inapreciables (Veenhuis *et al.*, 1983).
- La vía de generación de energía: En las bacterias metilotróficas la oxidación del metanol está acoplada a la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, en las levaduras metilotróficas se genera poder reductor en forma de NADH en reacciones posteriores a la fijación primera del metanol en formaldehído. Este NADH se produce en el citosol y se oxida, en ausencia de transportadores específicos hacia el interior de la mitocondria, gracias a la actividad de una NADH deshidrogenasa situada en la cara externa de la membrana mitocondrial interna (Moore *et al.*, 1980).

La figura 1 representa, a forma de resumen, las principales reacciones involucradas en el proceso de metabolización del metanol en levaduras, así como muestra gráficamente la compartimentalización del conjunto del proceso en el interior de la célula. Cada una de estas reacciones está descrita con

mayor detalle en los siguientes apartados, agrupadas según pertenezcan a la vía disimilatoria o asimilatoria de la oxidación del metanol.

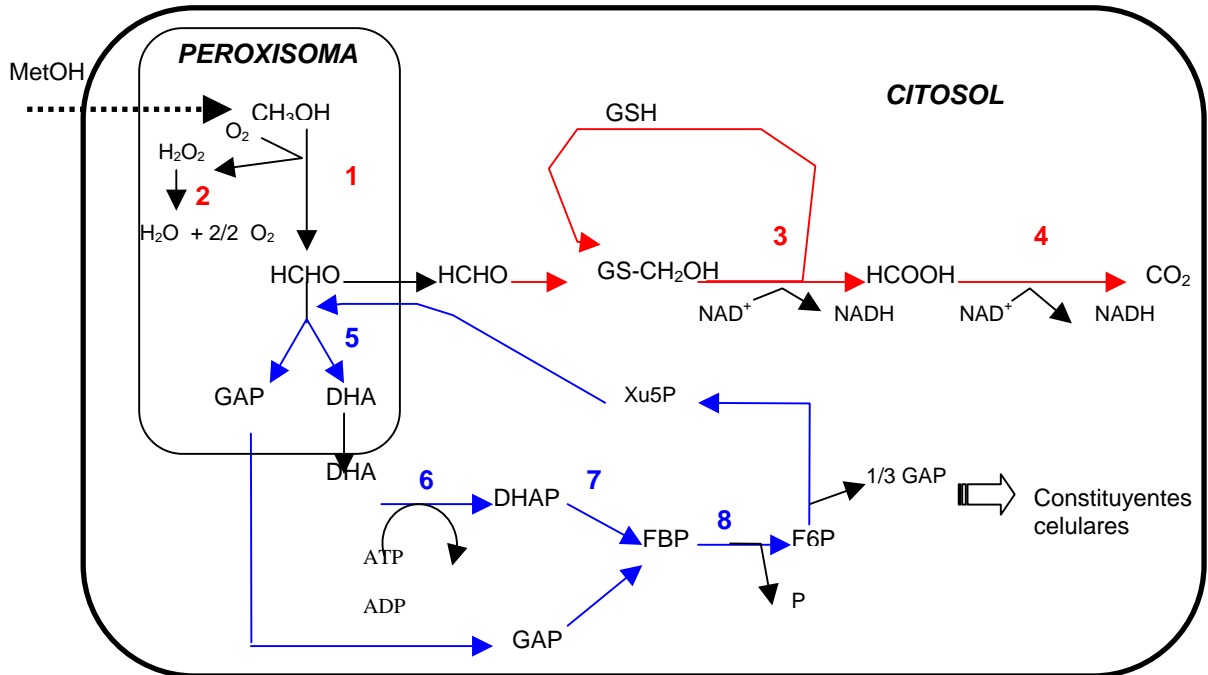


Figura 1. Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas. En rojo, vía disimilatoria y enzimas involucradas. En azul, vía asimilatoria y enzimas involucradas. 1: alcohol oxidasa (AOX). 2: catalasa. 3: formaldehído deshidrogenasa (FLD). 4: formiato deshidrogenasa (FMD). 5: dihidroxicetona sintasa (DAS). 6: dihidroxiacetona kinasa. 7: fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa. 8: fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa. Metabolitos:  $\text{CH}_3\text{OH}$ : metanol,  $\text{HCHO}$ : formaldehído,  $\text{GS-CH}_2\text{OH}$ : S-Formilglutaciona,  $\text{HCOOH}$ : formiato,  $\text{CO}_2$ : dióxido de carbono,  $\text{GAP}$ : gliceraldehído monofosfato,  $\text{DHA}$ : dihidroxiacetona,  $\text{DHAP}$ : dihidroxiacetona fosfato,  $\text{FBP}$ : fructosa 1,6-bisfosfato,  $\text{F6P}$ : fructosa 6-fosfato,  $\text{Xu5P}$ : xilulosa monofosfato.

### 1.3.1 Metabolismo ENERGÉTICO en levaduras metilotróficas.

En la vía energética de oxidación del metanol a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en levaduras metilotróficas (reacciones señaladas en rojo de la figura 1) se definen, básicamente, dos etapas:

- La primera etapa consiste en la oxidación del metanol a formaldehído. Esta reacción tiene lugar en el interior del peroxisoma, es esencial para la asimilación del metanol, pero de ella no se desprende energía alguna para la célula.
- En una segunda fase, parte del formaldehído generado abandona el peroxisoma y se oxida hasta  $\text{CO}_2$  en el citosol. Las enzimas que catalizan esta segunda fase son dependientes de  $\text{NAD}^+$  y de su actividad se desprende poder reductor en forma de  $\text{NADH}$ . Las levaduras metilotróficas obtienen energía para su actividad celular mediante la oxidación de este poder reductor ( $\text{NADH}$ ) generado en el citosol. Cada una de estas etapas puede diferir ligeramente entre diferentes

### **C. INTRODUCCIÓN GENERAL**

---

géneros de levaduras metilotróficas, pero, a grandes rasgos, éstas son las principales reacciones que tienen lugar.

En la levadura *P. pastoris*, la primera reacción de oxidación del metanol está catalizada por la enzima alcohol oxidasa (AOX), la cual se ubica en el interior de los peroxisomas. La alcohol oxidasa (AOX) requiere de la presencia de metanol y oxígeno molecular (como aceptor final de electrones), y su actividad sobre estos sustratos genera formaldehído y peróxido de hidrógeno como productos. La eliminación de estos subproductos es muy importante y esencial para la célula debido a que su acumulación resulta tóxica para la misma.

La enzima AOX está formada por ocho sub-unidades proteicas agrupadas en dos tetrámeros, y posee un tamaño molecular de aproximadamente 600 kDa (Van Dijken *et al.*, 1976). Esta es una enzima clave para la asimilación del metanol y su síntesis puede alcanzar hasta un 30% de la proteína soluble total de la célula, probablemente debido a sus características cinéticas (Veenhuis *et al.*, 1983, Cregg *et al.*, 1989). La alcohol oxidasa posee una baja afinidad por sus sustratos, el metanol y el oxígeno. En particular, el valor de la  $K_m$  para el oxígeno es de alrededor de 0.24-0.4 mM, mientras que la concentración máxima de oxígeno en aire saturado es aproximadamente de 0.2 mM (Harder *et al.*, 1987). Por lo tanto, la AOX ha de trabajar en el interior de la célula muy por debajo de sus condiciones óptimas, lo que se compensa aumentando la tasa de síntesis de la enzima para obtener elevadas concentraciones de ésta (Cregg *et al.*, 1989). Este hecho es muy importante en la expresión de proteínas heterólogas que se hallan bajo el control del promotor del gen que codifica para esta enzima.

Paralelamente, la enzima catalasa también se sintetiza a niveles elevados, debido a que es la responsable de la eliminación del peróxido de hidrógeno formado en el interior del peroxisoma. La oxidación posterior del formaldehído hasta  $\text{CO}_2$  ocurre en el citosol, y se realiza a través de dos enzimas dependientes de  $\text{NAD}^+$ ; la formaldehído y la formato deshidrogenasa (FLD y FMD, respectivamente).

La formaldehído deshidrogenasa (FLD) no actúa sobre el formaldehído libre sino sobre un compuesto intermedio generado de forma espontánea a través de la reducción del formaldehído y la glutatióna (GSH), la S-hidroximetilglutatióna. La glutatióna (GSH) es un tiol tripéptido que forma parte de los sistemas de protección de la célula frente a determinadas condiciones de estrés de tipo nutricional, oxidativo o derivado de determinadas condiciones ambientales, como podría ser la acumulación de elevadas cantidades de metanol o formaldehído, lo cual es de especial importancia en procesos de cultivo en presencia de metanol (Penninckx, 2000). La formaldehído deshidrogenasa (FLD) cataliza la oxidación de este sustrato intermedio, la S-hidroximetilglutatióna, generando S-formilglutatióna y NADH.



Es importante mencionar que la formaldehído deshidrogenasa (FLD) está igualmente implicada en la vía de asimilación de las aminas metiladas como fuente de nitrógeno, característica conocida como metazotofía. La metazotofía está más ampliamente extendida entre los distintos géneros de levaduras que la capacidad de asimilar metanol como única fuente de carbono y energía. La desmetilación de las aminas metiladas genera formaldehído y amonio. El amonio se utiliza como fuente de nitrógeno y el formaldehído se oxida hasta CO<sub>2</sub> mediante la FLD y las sucesivas enzimas citadas en la vía de asimilación del formaldehído generado a partir del metanol.

Siguiendo con la vía de asimilación del metanol, la S-formilglutaciona, generada por la FLD, es posteriormente oxidada hasta CO<sub>2</sub> mediante la enzima formato deshidrogenasa (FMD). Esta oxidación se realiza bien de forma directa o a través del compuesto generado de la hidrólisis de la S-formilglutaciona.

En algunas levaduras metilotróficas, como por ejemplo en *C. boidinii*, existen hidrolasas específicas que hidrolizan la S-formilglutaciona en formato y glutaciona. El formato generado se oxida a través de la formato deshidrogenasa (FMD) a CO<sub>2</sub>, y se genera NADH. Sin embargo, Van Dijken *et al.* (1976), comprobó *in vitro*, mediante una suspensión de formato deshidrogenasa purificada de *H. polymorpha*, la oxidación directa de la S-formilglutaciona tan sólo en presencia de NAD<sup>+</sup>.

Así pues, la vía definitiva por la que se oxida el formaldehído hasta CO<sub>2</sub> parece variar entre los géneros de levaduras metilotróficas. En cualquier caso, el poder reductor generado en este proceso (NADH) se localiza fuera de las mitocondrias, y su oxidación se lleva a cabo mediante una enzima (NADH deshidrogenasa) localizada en la parte externa de la membrana mitocondrial interna, que canaliza los equivalentes reductores en la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, durante el crecimiento en presencia de otras fuentes de carbono, como la glucosa, la generación de energía depende de una NADH deshidrogenasa situada en la cara interna de la membrana mitocondrial que oxida el NADH producido en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), que tiene lugar en el interior de la mitocondria. En este caso se generan más moles de ATP a partir de un mol de NADH, lo que explicaría la diferencia de velocidades de crecimiento de las levaduras metilotróficas en relación con la fuente de carbono utilizada para su cultivo (Moore *et al.*, 1980).

No obstante, existen estudios recientes realizados en las levaduras *C. boidinii* y *H. polymorpha*, que apuntan a la existencia de una vía independiente de la glutaciona para la oxidación del formaldehído hasta CO<sub>2</sub> que resulta energéticamente más rentable (Sakai *et al.*, 1995, Murdanoto *et al.*, 1997). Esta vía implica la formación de metil formato a través de la oxidación del formaldehído mediante la enzima metil formato sintasa (MFS). Esta enzima es una alcohol deshidrogenasa de tipo III unida a NAD<sup>+</sup> que se localiza en el interior de la mitocondria (Murdanoto *et al.*, 1997). Por lo tanto, esta vía de consumo del formaldehído supone una vía energéticamente más rentable puesto que los equivalentes reductores, generados en forma de NADH por la enzima metil formato sintasa (MFS), se encuentran directamente en el interior de la mitocondria. Determinados cambios en las rutas metabólicas de los

## **C. INTRODUCCIÓN GENERAL**

---

microorganismos están asociados a cambios en las condiciones fisiológicas de crecimiento de estos, por lo que se sostiene la posibilidad de que ésta sea una vía alternativa de destoxificación del formaldehído, y generación de energía, para la célula en presencia de elevadas concentraciones de este sustrato (Murdanoto *et al.*, 1997).

### **1.3.2 Vía de ASIMILACIÓN DEL C en levaduras metilotróficas.**

Las reacciones descritas a continuación se resumen gráficamente en la figura 1 de la página 9 (señaladas en azul), y corresponden a la vía por la cual el C del metanol se asimila en las levaduras metilotróficas sintetizándose enlaces C-C para la generación de material celular.

Básicamente, esta síntesis se lleva a cabo mediante la condensación de triosas en hexosas. Las triosas proceden de la fijación del formaldehído que se encuentra en los peroxisomas (originado por la oxidación del metanol). El resultado neto de esta vía es la formación de un mol de triosas por cada 3 moles de formaldehído y 3 moles de ATP.

En concreto, las triosas formadas son la gliceraldehído monofosfato (GAP), y la dihidroxiacetona (DHA). En la levadura *P. pastoris* estos compuestos se obtienen a partir de la transferencia de un grupo glicolaldehído desde la xilulosa monofosfato ( $Xu_5P$ ) al formaldehído, por lo que esta vía de asimilación del C se conoce como vía de la xilulosa monofosfato, y la enzima clave que realiza esta transferencia es la dihidroxiacetona sintasa (DAS), que se encuentra dentro de los peroxisomas (Goodman *et al.* 1985). Posteriormente, la dihidroxiacetona (DHA) se fosforila (DHAP) y se condensa con la gliceraldehído monofosfato (GAP) formando la fructosa 1,6-bisfosfato (FBP). Dos moléculas de fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) y una de dihidroxiacetona fosforilada (DHAP) se combinan, mediante determinadas reacciones, para generar tres moléculas de  $Xu_5P$ , con lo que el ciclo queda cerrado.

La ubicación de las diferentes enzimas involucradas en la asimilación del metanol y de algunos de sus metabolitos intermediarios varía entre el interior del peroxisoma y el citosol. Por lo tanto, la vía de asimilación del C en las levaduras metilotróficas también ocurre de forma compartimentalizada y supone un tránsito de los componentes del sistema hacia dentro y fuera del peroxisoma.

## **2. *Pichia pastoris* COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS.**

### **2.1 ¿Por qué *Pichia pastoris*?**

*P. pastoris* es una levadura metilotrófica facultativa perteneciente al grupo de los ascomicetes, que se reproduce por gemación, homotática y cuya dotación genómica permanece haploide (a menos que se someta a condiciones de limitación por nitrógeno) (Lin Cereghino *and* Cregg, 2000).

En particular, *P. pastoris* posee ciertas propiedades que justifican el éxito de su acrecentada utilización como sistema eucariota de expresión de proteínas heterólogas. Sin duda, la principal de estas características es la existencia de un promotor fuerte (es decir, de elevado nivel de transcripción) y altamente regulable: el promotor de la alcohol oxidasa, P<sub>AOX1</sub>.

También hay que destacar que *P. pastoris* es un microorganismo preferentemente respirativo. Este hecho evita la generación de subproductos indeseables típicos de procesos fermentativos, como el etanol, lo que facilita su cultivo a elevadas densidades celulares (>100 g de peso seco l<sup>-1</sup>). Alcanzar elevados niveles de biomasa es muy deseable en la expresión de proteínas que van asociadas al crecimiento celular.

Respecto a las modificaciones post-traduccionales generadas por *P. pastoris*, éstas se asemejan más a las de organismos eucariotas superiores que las realizadas, por ejemplo, por *S. cerevisiae*. A diferencia de este último, *P. pastoris* no hiperglicosila, es decir, la longitud máxima de las cadenas de oligosacáridos introducidas no supera los treinta residuos de manosa, en comparación a los 50 ó 150 residuos generados por *S. cerevisiae* (Lin Cereghino *and* Cregg, 2000). Además, *P. pastoris* no contiene la enzima responsable de la formación de residuos tipo  $\alpha$  1,3-manosa, principal causante de la naturaleza antigénica de las glicoproteínas expresadas en *S. cerevisiae* y que imposibilitan su uso con fines terapéuticos (Cregg *et al.*, 1993).

Por otra parte, *P. pastoris* prácticamente no secreta proteínas nativas al medio extracelular, lo que simplifica el proceso de recuperación y purificación de aquéllas foráneas (cuando su expresión es extracelular).

Con referencia a las técnicas de manipulación genética en *P. pastoris*, éstas son aparentemente sencillas y similares a las desarrolladas en *S. cerevisiae*. Igualmente, el hecho de ser un microorganismo haploide también representa una ventaja en cuanto a que cualquier mutación genética se manifiesta fenotípicamente.

### 2.2 Promotor de la AOX1 en *P. pastoris* : Aspectos generales de su regulación.

La enzima alcohol oxidasa es la responsable de la primera de las reacciones de oxidación del metanol en *P. pastoris*, y su síntesis está principalmente regulada por el promotor utilizado por excelencia en la expresión de proteínas heterólogas en este microorganismo, el  $P_{AOX1}$ . No obstante, existen dos genes responsables de la síntesis de la enzima, el gen de la alcohol oxidasa 1 (AOX1) y el 2 (AOX2) (Cregg *et al.*, 1989).

La secuencia de nucleótidos codificante para la alcohol oxidasa es homóloga en un 92% entre AOX1 y AOX2. La proteína generada por cada uno de ellos comparte una homología del 95% en cuanto a composición aminoacídica, y del 97% en cuanto a actividad específica (Koutz *et al.*, 1989).

¿Cuál es pues el significado biológico de este hecho?. Es decir, ¿por qué la célula dispone de dos genes que codifican, aparentemente, la misma proteína?. Existen ejemplos de pequeñas familias de genes, descritas en otros géneros y especies de levaduras, en los que el aumento de la dosis génica es necesario para la obtención de los niveles de proteína necesarios en la célula, como por ejemplo, los genes *TUB1* y *TUB3* que codifican para la  $\alpha$ -tubulina en *S. cerevisiae*. En otros casos, estas pequeñas familias están formadas por genes que responden a sistemas de regulación distintos, de forma que confieren versatilidad a la célula respecto a las condiciones de crecimiento o ambientales en las que se puede inducir la expresión de aquéllos. Este es el caso, por ejemplo, de los genes que codifican para la enzima alcohol deshidrogenasa, *ADH1* y *ADH2*, en *S. cerevisiae* (Cregg *et al.*, 1989).

Sin embargo, éstas no parecen ser explicaciones que justifiquen la existencia de los genes AOX1 y AOX2 de *P. pastoris*. Estos dos genes están regulados de forma similar, el producto de cada uno de ellos se localiza de igual manera en el interior de los peroxisomas y no presenta actividades relativas diferentes hacia substratos distintos (Cregg *et al.*, 1989). Además, otros géneros de levaduras metilotróficas, como *H. polymorpha* o *C. boidinii*, tan sólo disponen de un único gen que codifique para la enzima alcohol oxidasa, por lo que tampoco parece que sea un hecho muy común entre géneros. Sin embargo, quizás simplemente no se han podido reproducir todavía, a nivel de laboratorio, aquellas condiciones fisiológicas o ambientales en las que la disponibilidad de los dos genes para la alcohol oxidasa resulte ventajosa para la célula (Cregg *et al.*, 1989).

Por otro lado, existe otro tipo de estudios realizados con levaduras que, si bien no explican el valor selectivo de este hecho, apuntan hacia su posible origen evolutivo. En su mayoría, estas explicaciones están basadas en un fenómeno de duplicación genómica que ocurrió en las levaduras hace más de  $10^8$  años, y en translocaciones recíprocas entre fragmentos de DNA que generaron secuencias homólogas dispersadas como parejas de regiones duplicadas a lo largo del genoma (Seoighe *et al.*, 1998). Estudios filogenéticos y de análisis de secuencias de DNA revelan la conservación de ciertas estructuras genéticas entre levaduras. En concreto, en el genoma de *P.*

*pastoris* se han descrito un 20% de uniones conservadas, respecto al de *S. cerevisiae* (Seoighe *et al.*, 1998). También es posible que, las variaciones observadas entre los genomas actuales de diversas especies de levaduras de un mismo género se originaron, a lo largo de la evolución, mediante la remodelización del mismo a través de mecanismos moleculares, durante los cuales, ciertos genes saltaron “libremente” de un cromosoma a otro (Piskur *et al.*, 1998).

Respecto los genes de *P. pastoris* *AOX1* y *AOX2*, y como ya se ha mencionado, ambos parecen estar regulados de forma similar, y se ha observado que esta regulación actúa al nivel de la transcripción (Cregg *et al.*, 1988). Sin embargo, el nivel de transcripción alcanzado por cada uno de ellos es muy diferente. El gen *AOX1* es el responsable de la síntesis del 90% de la alcohol oxidasa generada en la célula, mientras que el gen *AOX2* codifica tan sólo el 10% restante (Cregg *et al.*, 1989). Estas diferencias se deben a las zonas no homólogas entre ambos genes, las cuales se encuentran fuera de la región codificante de cada uno de ellos, es decir, en posición 5' y 3' (Koutz *et al.*, 1989).

La elevada tasa de transcripción del gen *AOX1* es una de las dos principales características por la que este es el promotor más ampliamente utilizado para la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. La segunda característica fundamental es su estricta regulación. La alcohol oxidasa, al igual que otras enzimas involucradas en la oxidación del metanol, está controlada a nivel de transcripción (Cregg *et al.*, 1988). En células crecidas en metanol, los niveles de mRNA detectados para la alcohol oxidasa llegan hasta un 5% del total de mRNA polyA<sup>+</sup>. Sin embargo, en condiciones de crecimiento en presencia de otras fuentes de carbono, como la glucosa, estos niveles son prácticamente indetectables (Cregg *et al.*, 1988).

El sistema de regulación de la transcripción del gen *AOX1* está sometido a dos tipos de mecanismos, un sistema de represión/derepresión por catabolito y uno de inducción específica por sustrato, que en este caso concreto es el metanol (Tschopp *et al.*, 1987). En *P. pastoris* las condiciones de derepresión no son suficientes para que se dé una transcripción significativa del gen *AOX1*, sino que se requiere de la presencia del sustrato inductor. Es decir, en condiciones de crecimiento en las que la fuente de carbono represora (glucosa o glicerol) se ha agotado por completo (o se encuentra en concentraciones limitantes), los niveles de mRNA correspondientes al gen *AOX1* detectados en la célula son tan sólo un 2% de aquéllos observados en presencia de metanol (Tschopp *et al.*, 1987, Harder *et al.*, 1987). No obstante, estas condiciones sí que son suficientes para que se observen niveles elevados de expresión de las enzimas metanol oxidasa y formato deshidrogenasa, codificados por los genes *MOX* y *FMD*, de las levaduras metilotróficas *H. polymorpha* y *C. boidinii*, respectivamente, al igual que también se detectan niveles de expresión de otras enzimas relacionadas con la vía asimilatoria del metanol en la propia *P. pastoris*, como la formaldehído o la formato deshidrogenasa (Harder *et al.*, 1987, Mayer *et al.*, 1999).

Todas estas observaciones son importantes a la hora del diseño de los cultivos de producción de proteínas heterólogas mediante *P. pastoris* bajo el  $P_{AOX1}$ . Por un lado, no se requiere la presencia de concentraciones elevadas de la fuente de carbono represora durante la primera etapa del cultivo, sino tan sólo aquéllas que satisfagan los requerimientos nutricionales de las células. Una vez consumida esta fuente de carbono, la inducción de la expresión se consigue mediante la adición de metanol al medio de cultivo.

La mayoría de vectores de expresión diseñados para *P. pastoris* poseen el  $P_{AOX1}$  y están sometidos por lo tanto a este tipo de control. La estructura básica de un vector de expresión típico de *P. pastoris* se resume a continuación.

### **2.3 Vectores de expresión, fenotipo Mut (*Methanol utilisation*) y cepas comerciales de *Pichia pastoris*.**

#### **2.3.1 Vectores de expresión en *P. pastoris*.**

La estructura general de los vectores de expresión de *P. pastoris* se compone de las siguientes secuencias de DNA: un promotor de transcripción, uno o varios sitios únicos de restricción (donde clonar el gen de interés), una secuencia terminadora 3' propia de *P. pastoris* (que asegure la transcripción correcta del gen), un marcador de selección para *P. pastoris*, así como una secuencia de replicación y selección propias de *E. coli*.

Estos plásmidos son en su mayoría integrativos, es decir, recombinan con zonas homólogas del genoma de la célula asegurando así su mayor estabilidad. Por lo tanto, los vectores de expresión también incluyen zonas homólogas al genoma de *P. pastoris*, con el propósito de dirigir la recombinación de éstos a sitios específicos dentro del cromosoma. En los vectores de *P. pastoris* estas secuencias homólogas son, o bien una región del gen de la alcohol oxidasa 1, *AOX1*, o el gen de la histidinol deshidrogenasa, *HIS4*. El gen *HIS4* es considerablemente grande (3 kb) y su uso está limitado a cepas de *P. pastoris* auxotróficas para el aminoácido histidina. Existen otros vectores que incorporan, además del gen *HIS4*, un segundo marcador celular, el gen de la ampicilina (*E. coli*), o el gen de la kanamicina (*E. coli*) que ofrece resistencia al compuesto G418 (Higgins *et al.*, 1998). Sin embargo, esto aumenta aún más el tamaño molecular de los vectores, lo que dificulta su manipulación durante las etapas de clonación y transformación.

Alternativamente, existe una serie de vectores que poseen una secuencia de DNA homóloga a la región 3' del gen de la AOX, dirigiendo así la inserción a este *locus* e incluyen, además, un marcador celular de menores dimensiones, el gen *SH BLE* (*Streptoalloteichus hindustanus*). Este gen, de tan sólo 375 bp, codifica una proteína que confiere resistencia a la bleomicina Zeocina, cuya actuación es efectiva en *E. coli*, levaduras, y otros eucariotas (Gatignol *et al.*, 1988). Esta estructura reduce

substantialmente las dimensiones de los vectores hasta en 3.5 kb. Además, estos vectores permiten la selección directa de los clones transformados, a diferencia de los que incorporan el gen *HIS4*, que además de la selección por ampicilina o kanamicina, se han de seleccionar aquellos que son *his*<sup>+</sup>.

Para la expresión de proteínas extracelulares, existen vectores que poseen señales de secreción. La más utilizada es la secuencia de codificación de la región *prepo* del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, aunque también existen plásmidos que poseen la secuencia señal derivada del gen de la fosfatasa ácida de *P. pastoris*, *PHO1*.

En la tabla 1 se resumen algunos de los vectores más utilizados de *P. pastoris* y se indican sus características principales.

Vector	Promotor	Marcador de selección	Tipo de expresión	Características de su utilización
pAO815	P <sub>AOX1</sub>	<i>HIS4</i>	I	Generación de múltiples copias
pHIL-D2	P <sub>AOX1</sub>	<i>HIS4</i>	I	Substitución del gen <i>AOX1</i>
pPIC3K	P <sub>AOX1</sub>	<i>HIS4</i> & <i>kan</i> <sup>r</sup>	I	MCS. Selección de multicopias por resistencia a G418
pPICZ	P <sub>AOX1</sub>	<i>ble</i> <sup>r</sup>	I	MCS. Selección de multicopias por resistencia a Zeocina. His y myc tags.
pHOW10	P <sub>GAP</sub>	<i>HIS4</i>	I	Promotor constitutivo, P <sub>GAP</sub>
pGAPZ	P <sub>GAP</sub>	<i>ble</i> <sup>r</sup>	I	P <sub>GAP</sub> , MCS. Resistencia a Zeocina. His y myc tags.
pHIL-S1	P <sub>AOX1</sub>	<i>HIS4</i>	S	Señal de secreción <i>PHO1</i>
pPIC9K	P <sub>AOX1</sub>	<i>HIS4</i> & <i>kan</i> <sup>r</sup>	S	Señal de secreción $\alpha$ -MF prepo. Selección de multicopias por resistencia a G418.
pPICZ $\alpha$	P <sub>AOX1</sub>	<i>ble</i> <sup>r</sup>	S	Señal de secreción $\alpha$ -MF prepo. MCS. Resistencia a Zeocina. His y myc tags.
pGAPZ $\alpha$	P <sub>GAP</sub>	<i>ble</i> <sup>r</sup>	S	P <sub>GAP</sub> . Señal de secreción $\alpha$ -MF prepo. Resistencia a Zeocina. His y myc tags.

Tabla 1. Principales vectores de expresión en *P. pastoris*. **I**: intracelular. **S**: secretada. **MCS**: *multiple cloning site*. **HIS4**: gen de la histidinol deshidrogenasa. **ble**<sup>r</sup>: resistencia al compuesto Zeocina. **Kan**<sup>r</sup>: resistencia a la droga G418. [Adaptado de Higgins *et al.*, (1998)].

En la actualidad, la lista de vectores de expresión desarrollados en *P. pastoris* es mayor, según se incrementan los estudios de aislamiento de genes y marcadores alternativos en este microorganismo, a pesar de que no todos ellos están a disposición comercial.

Para una visión más documentada, consultar Lin Cereghino *and* Cregg, (2000), Higgins *et al.*, (1998) y <http://www.kgi.edu/html/noncore/faculty/cregg> (en *P. pastoris* expression system).

### 2.3.2 Fenotipo Mut (*Methanol utilisation*) y cepas comerciales de *P. pastoris*.

Como ya se ha mencionado, la inserción del vector de expresión puede estar por lo general dirigida al gen *HIS4* o al *AOX1* del genoma de *P. pastoris*. En el primero de los casos, la recombinación implica la incorporación del gen *HIS4*, pudiendo efectuar la selección de los clones transformados  $his^+$ , en cepas originalmente  $his^-$ . El segundo caso merece una descripción más detallada, en cuanto a que la recombinación entre la zona 3' del gen *AOX1* del vector y del genoma celular puede devenir en la delección o no del gen *AOX1* de *P. pastoris*.

La delección del gen *AOX1* implica desproveer a la célula del 90% de la enzima alcohol oxidasa, quedando tan sólo el gen *AOX2* funcional. Este tipo de células metabolizan muy lentamente el metanol, debido a la baja concentración de alcohol oxidasa sintetizada, y se conocen como  $Mut^s$  (*methanol utilisation slow*). Por el contrario, las cepas  $Mut^+$  (*methanol utilisation plus*) son aquellas en las que la recombinación e inserción del casete de expresión no implica la interrupción del gen *AOX1*, y la síntesis de alcohol oxidasa no se ve afectada. Este hecho afecta de forma importante la capacidad de metabolización del metanol por la célula y, por lo tanto, la velocidad de crecimiento de ésta en metanol.

La delección del gen *AOX1* celular depende del modo en que se produzca la recombinación específica entre las secuencias homólogas del gen y el vector. Según se haya realizado la linealización del plásmido se originan uno o dos extremos homólogos al gen *AOX1*, de forma que se favorece la recombinación simple o doble entre las secuencias. En aquellos casos en los que se produce recombinación simple, la inserción del gen foráneo se obtiene sin afectar al *AOX1* cromosómico. Por el contrario, la recombinación doble, en la que ambos extremos del vector son homólogos al gen *AOX1*, supone la incorporación del vector mediante substitución, y por lo tanto la pérdida del gen *AOX1*. En la figura 2 se resume gráficamente cómo se genera este proceso.



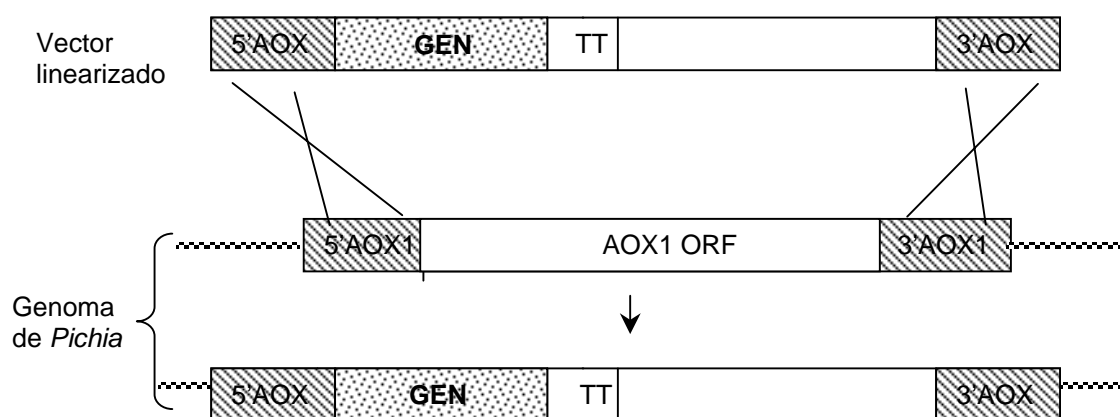


Figura 2. Recombinación doble entre los extremos homólogos del vector y el genoma de *P. pastoris* que supone la inserción del gen de interés mediante pérdida del gen *AOX1* celular, y por lo tanto, generación de una fenotipo  $Mut^s$ .

Existen cepas comerciales de cada uno de los fenotipo  $Mut^{+/s}$ , inclusive una cepa  $Mut^-$  en la que ambos genes *AOX* se han deletado. Todas las cepas comerciales de *P. pastoris* derivan de la NRRL-Y 11430 (*Northern Regional Research Laboratories*, Peoria, IL) (Higgins *et al.*, 1998). Sus nombres y características genéticas se especifican en la tabla 2.

Cepa de <i>P.pastoris</i>	Genotipo	Fenotipo
GS115	<i>his4</i>	$Mut^+ His^-$
X-33	<i>Wt</i> (GS115 revertida*)	$Mut^+ His^+$
KM71	<i>aox1Δ::SARG4 his4 arg4</i>	$Mut^s His^-$
MC100-3	<i>aox1Δ::SARG4 aox2Δ::Phis4</i>	$Mut^- His^-$
	<i>his4 arg4</i>	
SMD 1168	<i>pep4Δ his4</i>	$Mut^+ His^-$ proteasa-
SMD 1165	<i>prb1 his4</i>	$Mut^+ His^-$ proteasa-
SMD 1163	<i>pep4 prb1 his4</i>	$Mut^+ His^-$ proteasa-

Tabla 2. Principales cepas comerciales de *P. pastoris*. \*): La cepa X-33 proviene de la GS115 en la que se ha recuperado la funcionalidad del gen *HIS4* mediante transformación con el vector pPIC9K (ver tabla 1, página 17). [Higgins *et al.*, (1998)].

Las cepas GS115 y KM71 son las más ampliamente utilizadas para la expresión de proteínas heterólogas, junto con la recientemente comercial *P. pastoris* X-33.

Las cepas SMD 1168, 1165 y 1163 son deficientes respecto a la generación de proteasas. En cultivos de elevada densidad celular, la lisis de parte de la biomasa libera proteasas vacuolares al medio de

cultivo que pueden degradar las proteínas expresadas y secretadas por *P. pastoris*. El gen *PEP4* codifica la proteinasa A, necesaria para la activación de ciertas proteasas vacuolares. El gen *PRB1* codifica la proteinasa B. Por lo tanto, la doble delección de *PEP4* y *PRB1* disminuye substancialmente la actividad proteolítica de la cepa (Higgins *et al.*, 1998).

### **2.4 Expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* bajo el $P_{AOX1}$**

Existen varios parámetros que pueden afectar la expresión de proteínas heterólogas bajo el control transcripcional del  $P_{AOX1}$  en *P. pastoris*. Algunos de ellos son intrínsecos al sistema de expresión, por ejemplo, el fenotipo Mut de la cepa, el lugar de inserción del gen de interés dentro del genoma celular, el número de copias del gen foráneo, el tipo de expresión intra o extracelular, la naturaleza de la señal de secreción (en caso de expresión extracelular) o la actividad de proteasas endógenas.

Otros factores están más relacionados con la proteína en cuestión a expresar, como por ejemplo, el contenido GC/AT del gen a expresar o el grado de toxicidad de la proteína foránea para la célula hospedadora. Asimismo, otros factores importantes son la estabilidad de su mRNA, así como las modificaciones post transcripcionales y/o traduccionales requeridas (Gellisen G., 2000).

El otro gran bloque de parámetros que influye sobre el proceso de producción está formado por aquellos factores relacionados con la operación de cultivo, es decir, parámetros físicos como la temperatura, la agitación y aireación, o químicos, como el pH o la composición del medio de cultivo, así como la estrategia de inducción con metanol a seguir.

Estos diferentes grupos de factores están a su vez relacionados entre sí, y la definición de la estrategia óptima de cultivo y producción de una proteína heteróloga bajo el  $P_{AOX1}$  en *P. pastoris* resulta ser, a día de hoy, un procedimiento empírico que depende de cada caso concreto. Sin embargo, cabe destacar que existen ciertas generalidades en los cultivos de *P. pastoris* a elevada densidad celular, como se comenta en el siguiente apartado.

## **3. CULTIVOS DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS A ELEVADA DENSIDAD CELULAR BAJO EL $P_{AOX1}$ EN *P. pastoris*.**

### **3.1 Aspectos generales del cultivo de *P. pastoris* en metanol.**

Básicamente, en los procesos de producción de proteínas heterólogas expresadas en *P. pastoris*, bajo el promotor  $P_{AOX1}$ , se define una primera etapa de crecimiento celular en la que se genera gran cantidad de biomasa, a través de la utilización de fuentes de carbono que proporcionan un elevado rendimiento biomasa/substrato, como el glicerol. El glicerol, a su vez, tiene un efecto menos represor

sobre el  $P_{AOX1}$  que otras fuentes de carbono, como la glucosa, por lo que es el sustrato mayormente utilizado durante esta etapa (etapa de *batch*). Posteriormente, se induce la expresión de la proteína heteróloga mediante el cambio de fuente de carbono a metanol. La adición de metanol, como única fuente de carbono y energía, implica la activación del  $P_{AOX1}$  alcanzando elevados niveles de expresión de la proteína alcohol oxidasa (para la posible asimilación del metanol) y del gen heterólogo en cuestión clonado bajo el mismo promotor.

Durante el diseño del proceso de cultivo de *P. pastoris*, la etapa de adición del metanol es, sin duda, la de mayor importancia, pues de ella depende básicamente el éxito del proceso. La metabolización del metanol genera subproductos tóxicos para la célula, como el formaldehído y el formato, además de la toxicidad intrínseca del propio metanol *per se*, cuando éste se encuentra a elevadas concentraciones. Por esto, es preciso determinar aquella velocidad de adición de metanol durante el *fed-batch* que sea lo menos perjudicial en términos de viabilidad celular y que asegure, al mismo tiempo, la expresión óptima de la proteína heteróloga en cuestión. Este tipo de consideraciones se resume con más detalle a lo largo del capítulo 1 de la sección E (Resultados y Discusión) de este trabajo, enfocado precisamente al estudio operacional del cultivo de *P. pastoris* para la producción de enzimas recombinantes.

Sin duda, el principal factor que influye sobre la capacidad de asimilación del metanol de las células de *P. pastoris* es su fenotipo Mut. Así pues, existen recomendaciones generales respecto la velocidad de adición de este sustrato, durante las primeras etapas del *fed-batch*, según el fenotipo Mut de la cepa con la que se trabaja.

Para las cepas Mut<sup>+</sup>, *Invitrogen Fermentation guidelines* recomienda la utilización de velocidades de adición de metanol iniciales de 3.6 ml h<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup> de cultivo, y una velocidad máxima de 10.9 ml h<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup> de cultivo. Para las cepas Mut<sup>s</sup> estas velocidades de adición de metanol oscilan entre los 1 ml h<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup> de cultivo inicial, hasta una velocidad máxima de 3 ml h<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup> de cultivo inicial. Sin embargo, estas velocidades de adición son tan sólo recomendaciones generales. Las velocidades de adición han de ajustarse al desarrollo propio de cada proceso de cultivo en particular, con el propósito de no llegar a acumular excesivos niveles de metanol en el caldo de cultivo que pudieran afectar la viabilidad celular, y por lo tanto, el proceso de producción de la proteína heteróloga.

Uno de los principales criterios utilizados para el ajuste de la velocidad de adición del metanol es la evolución del valor del oxígeno disuelto en el caldo de cultivo (como indicativo de la evolución del crecimiento celular). Según *Invitrogen Fermentation guidelines*, la lectura de la presión parcial del oxígeno disuelto en el caldo de cultivo (pO<sub>2</sub>) corresponde a la disponibilidad o limitación de la fuente de carbono en éste, es decir, del metanol. Así pues, un aumento en los valores de oxígeno disuelto, durante el *fed-batch*, indica una velocidad de consumo del metanol superior a la velocidad de adición a la que se proporciona, debiendo, por lo tanto, aumentar el caudal de adición de la fuente de carbono.

Como ya se ha mencionado, en el capítulo 1 de la sección E (Resultados y Discusión) de este trabajo está precisamente dedicado al estudio del proceso de cultivo en *fed-batch* para la expresión de una proteína heteróloga en *P. pastoris*, por lo que se comentará más extensamente el proceso de inducción y producción en sí.

### **3.2 Proteínas expresadas en *P. pastoris*.**

Hay que destacar que a lo largo de las últimas dos décadas, *P. pastoris* se ha consolidado como un sistema de expresión eficaz para la producción de proteínas heterólogas de diferentes propiedades y características. Los niveles de producción obtenidos son variables y pueden oscilar entre microgramos a varios gramos de proteína por litro de cultivo celular. El listado de proteínas expresadas en este microorganismo es extenso, hasta unas 220 citadas en Lin Cereghino *and* Cregg (2000), algunas de las cuales están siendo probadas para su utilización en clínica humana, como la albúmina de suero humana (Ohtani *et al.*, 1998).

Actualmente, el ritmo de publicaciones referentes a la expresión de proteínas heterólogas con este sistema de expresión crece de forma exponencial. Además, hay que mencionar la gran variedad respecto a la naturaleza de las proteínas heterólogas expresadas bajo este sistema. Se han obtenido tanto proteínas de origen bacteriano, propias de hongos y levaduras, de protistas, plantas, invertebrados, vertebrados no humanos, de origen humano y víricas.

En la tabla 3 se recogen algunos de estos ejemplos a forma de resumen, sin embargo, para una consulta más exhaustiva y actualizada consultar la dirección <http://www.kgi.edu/html/noncore/faculty/cregg>.

Origen de la proteína	Proteína	Tipo de expresión	Cantidad
BACTERIA	$\beta$ -Galactosidasa de <i>Escherichia coli</i>	I	2.0x10 <sup>3</sup> U mg <sup>-1</sup>
	Fragmento C de la toxina del tétanos de <i>Clostridium tetani</i>	I	12 g l <sup>-1</sup>
	Neurotoxina, serotipo A y B de <i>Clostridium botulinum</i>	I	78 mg l <sup>-1</sup>
HONGOS	$\alpha$ -Amilasa de <i>Bacillus licheniformes</i>	S	2.5 g l <sup>-1</sup>
	Fitasa de <i>Aspergillus niger</i>	S	65 U ml <sup>-1</sup>
	Lipasa 1 de <i>Candida rugosa</i>	S	150 U ml <sup>-1</sup>
	Isoenzimas lipolíticos de <i>Geotrichum candidum</i>	S	60 mg l <sup>-1</sup>
	Invertasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S	2.5 g l <sup>-1</sup>
	Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	S	9.3 mg l <sup>-1</sup>
PROTISTAS	Antígeno I de membrana apical de <i>Plasmodium vivax</i>	S	50 mg l <sup>-1</sup>
	Manosidasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	S	11.5 $\mu$ g l <sup>-1</sup>
PLANTAS	NADH nitrato reductasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	I	18 $\mu$ g g <sup>-1</sup>
	$\alpha$ -Galactosidasa del grano de café	S	400 mg l <sup>-1</sup>
INVERTEBRADOS	Enzima convertidor de la angiotensina I de <i>Drosophila melanogaster</i>	S	160 mg l <sup>-1</sup>
	Hirudina de Hirudo medicinalis	S	1.5 g l <sup>-1</sup>
	Proteína de la seda de araña	I	663 mg l <sup>-1</sup>
VERTEBRADOS (NO HUMANOS)	$\beta$ -caseína bovina	I	1 g l <sup>-1</sup>
	Factor de crecimiento epidérmico de ratón	S	450 mg l <sup>-1</sup>
	Hormona estimulante del folículo ovina	S	22 mg l <sup>-1</sup>
	Proteína anticongelante II del pez raya	S	30 mg l <sup>-1</sup>
HUMANOS	Proteína precursora amiloide de la enfermedad de Alzheimer	S	24 mg l <sup>-1</sup>
	Antígeno carcinoembriónico	S	20 mg l <sup>-1</sup>
	Caspasa-3	I	1 $\mu$ g g <sup>-1</sup>
	Endostatina	S	20 mg l <sup>-1</sup>
	Factor de crecimiento tipo insulina	S	600 mg l <sup>-1</sup>
	$\alpha$ -amilasa pancreática	S	20 mg l <sup>-1</sup>
	Albúmina de suero	S	3 g l <sup>-1</sup>
	Factor de necrosis tumoral	I	10 g l <sup>-1</sup>
VIRUS	Glicoproteína D del herpes virus bovino	S	20 mg l <sup>-1</sup>
	Antígeno de superficie de la hepatitis B	I	400 mg l <sup>-1</sup>

Tabla 3. Ejemplos de proteínas expresadas en *P. pastoris*. **I**: intracelular. **S**: secretada. [Adaptado de Lin Cereghino and Cregg, (2000)].

## **4. LIPASAS. ESTRUCTURA, FUNCIÓN E INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.**

### **4.1 Enzimas lipolíticos. Estructura, función y aplicaciones.**

Las lipasas constituyen un grupo muy versátil de enzimas debido a la gran cantidad de reacciones que catalizan y, por lo tanto, al elevado potencial de aplicaciones que poseen. Las lipasas (o enzimas con actividad lipolítica) son acilglicerol éster hidrolasas (EC. 3.1.1.3) que catalizan los enlaces éster de los triglicéridos, produciendo ácidos grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos y glicerol.

La estructura de las lipasas pertenece a la de las proteínas  $\alpha/\beta$  hidrolasas. Las lipasas poseen un centro activo formado por aminoácidos de carácter hidrofóbico, que está oculto bajo un fragmento polipeptídico de estructura  $\alpha$ -helicoidal. Al entrar en contacto con una interfase lipídica, este fragmento se desplaza exponiendo el centro activo de carácter hidrofóbico, que posee gran afinidad por el sustrato lipídico. Este fenómeno se denomina activación interfacial y es característico de las lipasas, a diferencia de lo que ocurre con las esterasas (capaces de hidrolizar enlaces éster de compuestos solubles) (Verger R., 1997).

Las aplicaciones de las lipasas son múltiples y variadas. Originalmente se han utilizado para la hidrólisis de grasas y aceites, aunque también son capaces de llevar a cabo el proceso inverso, es decir, sintetizar enlaces éster. Además, las lipasas catalizan reacciones de transesterificación e interesterificación. Debido a su estereoespecificidad, el potencial biotecnológico de las lipasas es enorme y despiertan un elevado interés para la industria alimentaria, agrícola, química, farmacéutica, clínica o cosmética, entre otros muchos sectores. Por ejemplo, la acción hidrolítica de las lipasas libera ácidos grasos responsables de las propiedades organolépticas de muchos productos lácteos. En la industria química, por otro lado, las lipasas se han utilizado para la síntesis de detergentes, o para la síntesis orgánica (síntesis de compuestos ópticamente activos), de gran interés en el área farmacéutica. Para un examen más detallado de las distintas aplicaciones de las lipasas, revisar Ghosh *et al.*, (1996), Jaeger *and* Reetz, (1998), Pandey *et al.*, (1999) y Schmidt-Dannert C., (1999).

### **4.2 Lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL).**

El hongo *Rhizopus oryzae* es una “cepa lipolítica” uno de cuyos hábitats naturales es el fruto de la palma. Es importante mencionar que, taxonómicamente, el hongo *R. oryzae* es sinónimo de *R. arrizhus*. De este hongo se ha aislado una lipasa extracelular conocida bajo la abreviatura de ROL (lipasa de *R. oryzae*) (Ben Salah *et al.*, 1994, Hiol *et al.*, 2000).

La síntesis de lipasas es una característica común en las distintas especies del género *Rhizopus*. Así pues, se han descrito hasta 30 lipasas diferentes sintetizadas por los distintos especies de este hongo, cuya principal aplicación es la modificación de lípidos. Las lipasas sintetizadas por las distintas

especies de *Rhizopus* difieren básicamente en ciertos aminoácidos. Por ejemplo, la lipasa de *R. oryzae* (ROL) se diferencia de las de *R. niveus* (RNL), *R. delemar* (RDL) y *R. javanicus* (RJL) en la sustitución de los grupos His 134 y Ile 234 por Asn y Leu, respectivamente (Minning *et al.*, 1998). Beer *et al.*, (1998) sostienen que las diferentes formas de lipasa derivadas de *Rhizopus* sp. son resultado del distinto procesamiento proteolítico de un mismo gen, dando lugar a diferencias respecto a la estructura tridimensional de la enzima, que se traducen en una diferente especificidad respecto a la longitud de las cadenas de los ácidos grasos que reconocen.

El gen que codifica para la lipasa extracelular de *R. oryzae* (*Gene Bank* AF229435, clasificado con el sinónimo de lipasa de *R. arrizhus*) comprende una secuencia señal de 26 aminoácidos, una pro-secuencia de 97 aminoácidos y la región de la lipasa madura de 269 aminoácidos (Beer *et al.*, 1996). La lipasa extracelular nativa de *R. oryzae* posee un peso molecular de 32 kDa (según análisis por SDS-PAGE), cuatro sitios potenciales de N-glicosilación y posee 3 puentes disulfuro en su estructura final (Ben Salah, 1994). La enzima nativa purificada es estable en el rango de pH de 4.5 a 7, a 30°C y un pH óptimo de actividad de 8.5 (Ben Salah *et al.*, 1994).

La expresión heteróloga de la lipasa madura de *R. oryzae* (ROL) fue realizada por primera vez en células de *E. coli*, por Beer *et al.*, (1996), aunque resultó en la formación de cuerpos de inclusión de costosa purificación. En el mismo trabajo, también se comprobó que la ROL madura posee cierta actividad fosfolipasa, por lo que la expresión de la enzima madura (desprovista de la pro-secuencia) resultaba tóxica para la célula. No obstante, la expresión de la lipasa junto con su pro-secuencia no mostraba estas propiedades, debido a que la pro-secuencia modula la actividad y el correcto plegamiento de la ROL en *E. coli* (Beer *et al.*, 1996). Resultados similares se observaron en la expresión extracelular de la ROL y la pro-ROL en *S. cerevisiae*. Los niveles de expresión de la pro-ROL obtenidos bajo este sistema fueron, sin embargo muy bajos (Takahashi *et al.*, 1998).

Minning *et al.*, (1998), realizaron por primera vez la expresión extracelular de la ROL madura en la levadura metilotrófica *P. pastoris* obteniendo unos niveles de producción satisfactorios (hasta 60 mg de enzima activa por litro de cultivo), y unas propiedades similares a las descritas para la ROL nativa. La ROL recombinante obtenida bajo este sistema de expresión posee un peso molecular de 30 kDa, un pH óptimo de actividad de 8.1 a 30°C y un punto isoeléctrico  $\geq 9.3$ .





**D. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.**

---

Los antecedentes a la realización de este trabajo se recogen básicamente en la publicación de Mining *et al.*, (1998). Resumidamente, en la publicación citada, se describe la producción recombinante de una lipasa madura de *R. oryzae* (ROL) expresada en la levadura *P. pastoris*.

Minning *et al.*, (1998) realizaron la construcción de la cepa de *P. Pastoris*, que contiene el gen *ROL*, bajo el control del  $P_{AOX1}$ , con lo que en este sistema la expresión de la lipasa es, por lo tanto, dependiente de la inducción por presencia de metanol. La cepa utilizada para la construcción es auxotrófica para el aminoácido histidina, por lo que la producción de la enzima se realizó utilizando un medio de cultivo de composición compleja y operando en la modalidad de *fed-batch*.

A lo largo de la etapa de *fed-batch*, la adición del substrato inductor, el metanol, se realizó en función de la lectura de la evolución del oxígeno disuelto en el caldo de cultivo. Se obtuvieron hasta 60 mg de la ROL recombinante por litro de cultivo en el medio extracelular y se realizó la caracterización de la misma.

Las propiedades de la ROL expresada en *P. pastoris* se citan como similares a las de la ROL recombinante obtenida, con anterioridad, en *E. coli* (Beer *et al.*, 1996) posteriormente a la resolubilización de los cuerpos de inclusión, en cuanto a pH, temperatura óptima y especificidad de substrato.

La expresión recombinante de la ROL en *E. coli* (Beer *et al.*, 1996) implica la resolubilización y recuperación de la misma desde los cuerpos de inclusión formados, siendo, por lo tanto, un proceso altamente costoso para su realización a gran escala.

Takahashi *et al.*, (1998) llevaron a cabo la expresión de la ROL recombinante en la levadura *S. cerevisiae*, pero los niveles de producción obtenidos fueron muy bajos.

Bajo el conjunto global de los antecedentes descritos, los objetivos planteados para la realización de este trabajo fueron los siguientes:

**OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO:**

1. Optimizar la producción recombinante de una proteína extracelular, en concreto, la expresión heteróloga de una lipasa del hongo *R. oryzae* (ROL) expresada en la levadura metilotrófica *P. pastoris* (prototrófica para el gen *HIS4*) bajo el  $P_{AOX1}$  utilizando un medio de cultivo de composición sintética, o definida. Para tal propósito se plantearon los siguientes subobjetivos:
  - 1.1. Analizar la influencia del proceso operacional de cultivo en *fed-batch* en los niveles de producción de la ROL alcanzados, y optimizar la estrategia de inducción a seguir para aumentar los niveles de la ROL en el medio extracelular, mediante el estudio de la etapa de inducción de *fed-batch* con metanol.
  - 1.2. Estudiar el efecto del aumento de la dosis génica en los niveles de producción recombinante de la ROL, así como la influencia del fenotipo celular Mut (*methanol utilisation*) de *P. pastoris* respecto a los niveles de producción de la proteína recombinante en cuestión.
  - 1.3. Evaluar el posible efecto tóxico de la expresión de la ROL sobre la cepa hospedadora mediante la realización de cultivos en presencia de substratos no represores de la expresión de la ROL.
2. Estudiar alternativas genéticas para la producción de la ROL bajo un sistema de expresión en *P. pastoris* que evite la utilización del metanol como substrato inductor de la producción de proteínas recombinantes evaluando su viabilidad o aplicación potencial en procesos de cultivo a elevada densidad celular. Se plantearon los subobjetivos:
  - 2.1. Desarrollar un sistema de expresión de la ROL constitutivo en *P. pastoris*.
  - 2.2. Obtener un sistema de expresión de la ROL inducible por fuente de nitrógeno.
3. Desarrollar un protocolo de recuperación y purificación de la ROL recombinante. Los subobjetivos planteados fueron:
  - 3.1. Desarrollar un proceso de recuperación y purificación de la ROL con un rendimiento tal que permita la utilización de la enzima en reacciones químicas.
  - 3.2. Desarrollar un proceso alternativo para la purificación de la ROL que permita la generación de anticuerpos contra ésta.

## **CAPÍTULO 1. Estudio de estrategias operacionales en *fed-batch* para la producción de una lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) expresada en *Pichia pastoris*. Efecto de la expresión heteróloga de la lipasa sobre el crecimiento celular.**

### **1.1 INTRODUCCIÓN**

Los niveles de producción de proteínas heterólogas, expresadas bajo el control del  $P_{AOX1}$  en *P. pastoris*, que se alcanzan en cultivos de elevada densidad celular, son variables y deben ser optimizados en cada caso (Cregg *et al.*, 1993). Varias lipasas se han expresado con éxito en *P. pastoris*. Todas, excepto una de origen humano (Sahasrabudhe *et al.*, 1998, Yang and Loewe, 1998), pertenecen a diferentes especies de hongos: la lipasas 1 y 4 de *Candida rugosa* (Brocca *et al.*, 1998, Tang *et al.*, 2001), las lipasas A y B de *Geotrichum candidum* (Catoni *et al.*, 1997, Holmquist *et al.*, 1997) y la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) (Minning *et al.*, 1998).

Concretamente, el estudio inicial sobre la producción de ROL en *P. pastoris* a escala de bioreactor, realizado por Minning *et al.*, (1998), se llevó a cabo utilizando un medio de cultivo complejo y el siguiente esquema de trabajo: Una primera fase de cultivo en *batch*, utilizando glicerol como fuente de carbono para generar biomasa, seguida de una etapa de inducción en *fed-batch*, alimentada por el substrato inductor, el metanol. La estrategia de alimentación del metanol en la fase de inducción es similar a la descrita por Rodríguez *et al.*, (1997) para la producción de dextranasa en *P. pastoris*, la cual se basa en una de las aproximaciones más utilizadas para el control de este tipo de cultivos. En particular, ésta es la estrategia recomendada por el manual de *In vitro fermentation guidelines*. Resumidamente, la estrategia consiste en el seguimiento del valor del oxígeno disuelto en el medio de cultivo como indicativo de la evolución del crecimiento celular y como base, por lo tanto, de la adición de substrato durante la etapa del *fed-batch*. El aumento del valor de la presión parcial del oxígeno,  $pO_2$ , en el caldo de cultivo se interpreta como una limitación de la fuente de carbono, y por lo tanto, se incrementa la velocidad de adición del substrato.

Sin embargo, existen factores característicos del proceso de cultivo en bioreactor que pueden afectar igualmente el valor de la  $pO_2$ , como la adición de antiespumante o las posibles variaciones de presión en la cabecera del bioreactor, y dar lugar, por lo tanto, a interpretaciones erróneas sobre la disponibilidad o carencia de metanol en el medio.

Igualmente, este método puede resultar poco eficaz si los niveles de metanol en el bioreactor no permanecen por debajo de aquella concentración de metanol que resulta tóxica para el crecimiento. En este supuesto, elevadas concentraciones de metanol afectarían el crecimiento celular reduciéndose la velocidad de consumo del mismo, provocando un aumento en el valor

del oxígeno disuelto en el medio que, erróneamente, se traduciría en un incremento de la velocidad de adición del metanol.

Así pues, la inhibición del crecimiento celular provocaría una menor producción de la proteína de interés (Katakura *et al.*, 1998). Además, hay que tener en cuenta que los niveles de transcripción del  $P_{AOX1}$  son superiores en condiciones de crecimiento con concentraciones limitantes de metanol (debido a las características propias de síntesis de la enzima AOX, ver sección C, Introducción General, página 10).

En este trabajo se estudia la producción de la ROL, expresada en *P. pastoris*, utilizando un medio de cultivo sintético, más económico que el complejo, inicialmente bajo el mismo esquema de adición de *fed-batch* sugerido por Minning *et al.*, (1998). El estudio se realiza con una cepa de *P. pastoris* Mut<sup>+</sup>, isogénica a la utilizada en el trabajo de Minning *et al.*, (1998) (con la mejora de que es prototrófica para el gen *HIS4*) y se analiza el posible efecto de la producción de la lipasa el crecimiento de la cepa en presencia de metanol.

Asimismo, se determinan algunos parámetros que resultan clave para la expresión de la ROL y se implementan modificaciones operacionales durante la etapa de inducción con el propósito de mejorar la productividad final alcanzada. Básicamente, estos cambios se basan en el seguimiento de la concentración de metanol y en la adición de substratos mixtos, utilizando combinaciones de glicerol y metanol, añadiendo una nueva etapa al proceso de cultivo.

## **1.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.2.1 Cepas y vectores.**

El vector pPICZ $\alpha$ A-ROL fue construido por S. Minning (Minning *et al.*, 1998). La cepa de *P. pastoris* X-33/ROL se obtuvo mediante transformación por electroporación con el vector pPICZ $\alpha$ A -ROL (S. Minning, *University of Stuttgart*, Alemania). En la figura 1 se ilustra este vector de expresión que contiene el gen *ROL*, de 900 bp, que codifica para la lipasa de peso molecular de 30 kDa. El vector pPICZ $\alpha$ A-ROL fue linealizado mediante *SacI* y la integración del mismo generó un fenotipo Mut<sup>+</sup> en la cepa X-33/ROL resultante.

La cepa control de *P. pastoris* X-33/pPICZ $\alpha$ A (no contiene el gen de la ROL) se construyó para este trabajo según el mismo procedimiento de transformación pero utilizando el vector comercial pPICZ $\alpha$ A (*Invitrogen*).

Las cepas GS115 (*HIS4*, Mut<sup>+</sup>) y KM71 (*HIS4*, Mut<sup>s</sup>) son comerciales (*Invitrogen*).

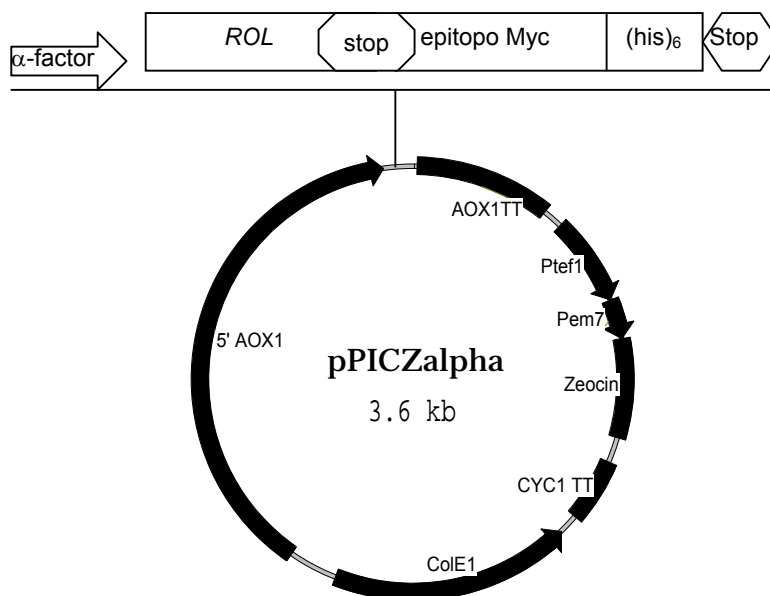


Figura 1. Representación del vector de expresión pPICZ $\alpha$ -ROL utilizado en el presente trabajo, construido por Minning *et al.*, (1998). El autor introdujo un codón de *stop* previo al epítipo *myc* para obtener una enzima totalmente comparable a la obtenida en *E. coli* por Beer *et al.*, (1996). **AOX1TT**: terminador de transcripción del gen *AOX1*, de *P. pastoris*. **P<sub>TEF1</sub>**: promotor del gen del factor de elongación transcripcional 1, de *S. cerevisiae*, que dirige la expresión del gen *SH BLE*. **P<sub>EM7</sub>**: promotor procariota que dirige la expresión del gen *SH BLE* en *E. coli*. **Zeocina**: gen de resistencia a la Zeocina, *SH BLE*, de *Streptoalloteichus hisdustanus*. **CYC1TT**: fragmento 3' del gen *CYC1* que permite el correcto procesamiento del gen *SH BLE*. **ColE1**: origen de replicación procariota. **5'AOX1**: fragmento 5' del gen *AOX1* de *P. pastoris*.

### 1.2.2 Mantenimiento de cepas.

Las células de *P. pastoris* y *E. coli* se mantuvieron a 4°C en placas de agar YPD y 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de Zeocina, y en placas de agar LB-*low salt*, respectivamente. La composición del YPD por litro de agua destilada es de 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de dextrosa, más 20 g de agar para la realización de placas. La composición del LB-*low salt*, por litro de agua destilada, es: 10 g de triptona, 5 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura, pH 7.5. Para el mantenimiento a -70°C a largo plazo se elaboraron glicerizados, con un 15 % (w/v) de glicerol para las células de *P. pastoris*, y un 10% (w/v) para las células de *E. coli*, en medio YPD y LB-*low salt* respectivamente.

### 1.2.3 Transformación: obtención de competentes y condiciones de electroporación.

Se utilizaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  comerciales (*Life Technologies*), y el protocolo de transformación, basado en choque térmico, proporcionado por la misma compañía.

Las células competentes de *P. pastoris* se elaboraron según el siguiente procedimiento: Se realizó un cultivo de *P. pastoris* X-33 en 5 ml de medio YPD líquido (composición en apartado

1.2.2) a 30°C, 250 rpm, durante 24 h, que se utilizó para inocular ½ litro de cultivo de medio YPD, dejándolo crecer hasta una densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 1.3-1.5, bajo las mismas condiciones. Las células se centrifugaron a 1500 xg, 10 minutos, a 4°C, y se resuspendieron en 100 ml de medio YPD + 2 ml HEPES 1 M (ácido 2-hidroxietilpiperazine-N'-2-butanosulfónico), pH 8.00. Se añadieron 2.5 ml de DTT 1 M (dithiothreitol) y se incubaron durante 15 minutos a 30°C y 100 rpm. Posteriormente, se llevó el volumen hasta 250 ml utilizando agua destilada estéril a 4°C y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Se realizó una tercera y cuarta centrifugación, en las mismas condiciones, resuspendiendo el sedimento de células en 250 ml y 125 ml de agua destilada estéril a 4°C, respectivamente. Posteriormente, se repitieron dos centrifugaciones más en las que se resuspendió el sedimento en 20 ml y 0.5 ml de sorbitol 1 M estéril a 4°C. Se realizaron alícuotas de 80 µl de células que se guardaron a -70°C. Las células de *P. pastoris* se transformaron por electroporación. La electroporación se realizó mezclando 80 µl de células competentes con 5-10 µg de DNA linearizado. La mezcla se incubó en hielo durante 5 minutos. El pulso eléctrico aplicado fue de 2500 v, utilizando un electroporador *Bio Rad Gene-Pulser*, a 25 µF de capacitancia, 400 Ω de resistencia, y cubetas estériles de 0.2 cm de tamaño de *Bio Rad*. Inmediatamente después se añadió 1 ml de sorbitol 1 M estéril, a 4°C, y se incubó la mezcla a 30°C durante una hora sin agitación. Posteriormente, se añadieron 0.8 ml de medio fresco YPD y se incubaron las células durante 3 h, a 30°C y 250 rpm. Por último, se sembraron 200 µl de esta suspensión de células en placas RDB (sorbitol 1 M, 10 g dextrosa, 13.4 g de *yeast nitrogen base (w/o aa & amonium sulfate)*, 4x10<sup>-4</sup> g de biotina y 20 g de agar, por litro de agua destilada). Las placas se incubaron a 30°C durante 72 h.

### 1.2.4 Medios de cultivo.

#### 1.2.4.1 *Determinación del fenotipo Mut<sup>+/s</sup>.*

Para la determinación del fenotipo Mut (*Methanol utilisation*) de las cepas, se emplearon placas MM(H) (composición por litro de agua destilada: 13.4 g de *yeast nitrogen base (w/o aa & amonium sulfate)*, 4x10<sup>-4</sup> g de biotina, 0.5% (v/v) de metanol, 20 g agar (y 0.04 g de histidina)) y placas MD(H) (composición por litro de agua destilada: 13.4 g de *yeast nitrogen base*, 4x10<sup>-4</sup> g de biotina, 20 g de dextrosa, 20 g de agar (y 0.04 g de histidina)). Para los cultivos en erlenmeyer, con el mismo propósito experimental, se realizaron cultivos de 250 ml de medio BMM(H), que contiene por litro de agua destilada; 13.4 g de *yeast nitrogen base (w/o aa & amonium sulfate)*, fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, 4x10<sup>-4</sup> g de biotina, (0.04 g de histidina), y un 0.5 % (v/v) de metanol. Los pre-inóculos utilizados crecieron en 50 ml de medio líquido YPD (composición en apartado 1.2.2.) con 100 µg ml<sup>-1</sup> de Zeocina, a 30°C y 250 rpm durante 15 h.

#### 1.2.4.2 *Cultivos con sorbitol.*

Los cultivos con sorbitol y/o metanol se realizaron en medio líquido, cuya composición, por litro de agua destilada es: 13.4 g de *yeast nitrogen base (w/o aa & amonium sulfate)*, fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, 4x10<sup>-4</sup> g de biotina, 5 g de sorbitol y/o un 0.5 % (v/v) de metanol.

#### 1.2.4.3 Cultivos a elevada densidad celular.

Los pre-inóculos e inóculos (para el cultivo en bioreactor) se realizaron en volúmenes de 50 y 500 ml respectivamente de medio rico BMGY, cuya composición, por litro de agua destilada, es de 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, fosfato de potasio 100 mM pH 6.0,  $4 \times 10^{-4}$  g de biotina y 10 g de glicerol. Las condiciones de crecimiento de los pre-inóculos e inóculos fueron de 30°C y 250 rpm de agitación. La  $DO_{600}$  final a la que se para el crecimiento de los inóculos (previamente al cultivo en bioreactor) es aproximadamente 40-50. Los inóculos se centrifugaron a 5000 rpm y las células se resuspendieron en medio sintético para su cultivo en bioreactor, a una  $DO_{600}$  inicial entre 0.5-1.0, operando en primer lugar en *batch* y posteriormente en *fed-batch*.

La composición del medio sintético utilizado en el bioreactor es, por litro de agua destilada:  $H_3PO_4$  (85 %) (26.7 ml),  $CaSO_4$  (0.93 g),  $K_2SO_4$  (18.2 g),  $MgSO_4 \times 7 H_2O$  (14.9 g), KOH (4.13 g), glicerol (40 g) y 4.35 ml de solución PTM1.

La composición del medio de cultivo complejo, por litro de agua destilada es la siguiente: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, tampón fosfato 100 mM pH 6.00,  $4 \times 10^{-4}$  g de biotina y 10 g de glicerol.

La solución de PTM1 contiene, por litro de agua:  $CuSO_4 \times 5 H_2O$  (6.0 g), NaI (0.08 g),  $MnSO_4 \times H_2O$  (3.0 g),  $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$  (0.2 g),  $H_3BO_3$  (0.02 g),  $CoCl_2$  (0.5 g),  $ZnCl_2$  (20.0 g),  $FeSO_4 \times 7 H_2O$  (65.0 g), biotina (0.3 g),  $H_2SO_4$  (conc., 5 ml).

Los substratos alimentados durante el *fed-batch* están compuestos de 12 ml de PTM1 por litro de glicerol (50%, w/v), o por litro de metanol 100%.

#### 1.2.5 Bioreactores y condiciones de operación.

Los experimentos de cultivo a elevada densidad celular se realizaron en un bioreactor *Braun Biostat E* con cuba de 5 litros de capacidad. El volumen de cultivo inicial en el bioreactor es de 3.5 litros llegando a un volumen final de cultivo de 5 litros.

La esterilización del medio de cultivo y del bioreactor en sí se realiza *in situ*. La solución de PTM1 se añade por filtración (filtros *Millipore-GV PVDF* de 0.22  $\mu m$  de poro) una vez la temperatura del bioreactor ha descendido a temperatura ambiente.

Las condiciones de operación en el bioreactor fueron las siguientes: 30°C de temperatura y pH 5.0 mantenido por adición de  $NH_4OH$  2 M (a excepción de los cultivos con medio complejo, que se mantienen a pH 6.00 por el medio tamponado). Asimismo, la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en un 20% de saturación a través de la modificación de la velocidad de

agitación entre las 500-900 rpm y el caudal de aire, entre 0.5-10 l min<sup>-1</sup>. El *software* utilizado fue diseñado para el presente trabajo por O. Cos (UAB).

### 1.2.6 Velocidad de adición de sustratos durante la etapa de *fed-batch*.

La alimentación durante el *fed-batch* se realizó mediante dos microburetas automáticas del tipo MicroBU-2031 de *Crison Instruments*, una para la alimentación de glicerol y otra para la alimentación del metanol. El caudal de adición de cada una de ellas se especifica de forma manual a través del programa diseñado por O. Cos (UAB).

La etapa de transición, en la que se alimentan ambos sustratos, se diseñó con una duración total de 5 h. La velocidad de adición del metanol se mantuvo constante en 100 µl min<sup>-1</sup> a lo largo de éstas, mientras que la de glicerol disminuyó continuamente. Durante las 2 primeras horas la velocidad de adición de glicerol se mantuvo en 300 µl min<sup>-1</sup>, 160 µl min<sup>-1</sup> durante la tercera hora, 100 µl min<sup>-1</sup> en la cuarta hora y 65 µl min<sup>-1</sup> durante la última hora. Es decir, se alimentó en una proporción de metanol/glicerol de 1: 3, 1: 1.6, 1: 1 y 1: 0.65. Estas velocidades de adición se realizaron automáticamente mediante el programa diseñado para tal propósito por O. Cos (UAB).

### 1.2.7 Métodos analíticos.

#### 1.2.7.1 *Biomasa.*

El cálculo de biomasa se realizó por determinación del peso seco celular. Muestras de 10 ml de cultivo se filtraron a través de filtros *Millipore*-MF de ésteres mezclados de celulosa de tamaño de poro de 0.45 µm. Los filtros se lavaron con el mismo volumen de agua destilada y se secaron a 100°C hasta llegar a peso constante.

La evolución del crecimiento celular también se llevó a cabo de forma cualitativa por el seguimiento del aumento de la DO<sub>600</sub>. Una unidad de DO<sub>600</sub> equivale aproximadamente a 5 x10<sup>7</sup> células de *P. pastoris* (Higgins *et al.*, 1998).

#### 1.2.7.2 *Análisis de actividad lipolítica extracelular.*

La medida de la actividad lipolítica se llevó a cabo a través del pH-stato 718 STAT *Titrino pH-stat* (*Metrohm*) utilizando una emulsión de aceite de oliva (50%, v/v) (*Sigma*) como sustrato. Se mezclaron 0.5 ml de emulsión con 4.5 ml de una solución salina de NaCl 0.25 M y CaCl<sub>2</sub> 0.05 M, utilizándose un volumen de muestra a analizar de 100 µl. El pH se mantuvo a 8.1 mediante valoración con NaOH 0.02 M, a una temperatura de análisis de 30°C. Una unidad de actividad lipolítica se define como la cantidad de enzima requerida para la liberación de un µmol de ácidos grasos por minuto, bajo las condiciones de ensayo descritas.



#### 1.2.7.3 *Análisis de metanol y glicerol.*

El análisis de la concentración de glicerol se realizó por HPLC (*High Performance Liquid chromatography*) (*Hewlett Packard* 1050), utilizando una columna de intercambio iónico *Aminex* HPX-87H (*Bio Rad*). La fase móvil utilizada fue ácido sulfúrico 15 mM y un volumen de inyección de 20  $\mu$ l. La cuantificación de los datos se realizó con el software *Millenium* 2.15.10 (*Waters*).

El análisis de metanol se realizó por cromatografía de gases (*Hewlett Packard* 5890) utilizando una columna capilar (*Tracsil* TR-FFAP 25m x 0.53mm x 1 $\mu$ m, de *Tracer-Teknokroma*), un inyector automático modelo 7673 (*Hewlett Packard*) y un detector FID. Las temperaturas del detector e inyector fueron de 280 y 200°C, respectivamente. La temperatura del horno se mantuvo a 40°C durante 2 minutos y, posteriormente, se realiza una rampa de aumento de temperatura de 20°C por minuto, hasta alcanzar los 200°C, que se mantienen durante un período de 5 minutos más. Se utilizó helio como gas transportador a un caudal de 9 ml min<sup>-1</sup>, e hidrógeno gas como combustible. La integración y cuantificación de los picos se realizó mediante el software *Millenium* 32 (*Waters*). Como patrón interno se utilizaron muestras de isopropanol a una concentración de 4 g l<sup>-1</sup>.

#### 1.2.7.4 *Análisis de proteasas.*

La actividad proteolítica se determinó utilizando el sustrato azocaseína según la metodología definida en Scheuning *and* Fritz, (1976). El ensayo fue realizado a pH 7.6.

#### 1.2.8 Digestión con endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase (Endo H).

La desglicosilación de las muestras de proteína se llevó a cabo con la enzima Endo H (125 U mg<sup>-1</sup>, de *Roche Diagnostics*) según las especificaciones de la casa comercial. La composición del tampón de incubación utilizado fue acetato de potasio 50 mM, pH 5.5, y PMSF 0.5 mM (fluorido de fenilmetil sulfonil).

#### 1.2.9 SDS-PAGE.

Los geles de poliacrilamida para electroforesis de proteínas se realizaron a un 12 % (w/v) de poliacrilamida y en condiciones desnaturalizantes, tal y como se describe en Laemmli U.K., (1970). Se utilizó el equipo de electroforesis *Mini Protein II cell vertical* (*Bio Rad*) y unas condiciones de voltaje constantes de 70-80 v. La visualización de los geles se realizó mediante tinción de *Comassie* y tinción de plata (según instrucciones de *Bio Rad*). Los marcadores de peso molecular de proteína utilizados fueron los *SDS-Broad Range* (*Bio Rad*).

#### 1.2.10 Secuenciación N-terminal.

La secuenciación N-terminal de la banda de la ROL obtenida por SDS-PAGE se realizó por el servicio de secuenciación de la UAB. La obtención de la muestra de proteína se realizó según el protocolo descrito en Sánchez *et al.*, (1999).

### 1.2.11 Cálculo de velocidades específicas.

La velocidad de crecimiento celular ( $\mu$ ) se calculó a partir de la aplicación del balance de materia de biomasa para la operación en *fed-batch*:

$$\mu \times V = d(XV)/dt$$

Donde X es la biomasa ( $\text{g l}^{-1}$ ), V el volumen de cultivo (l), que resulta de la suma del volumen inicial más el volumen añadido durante el *fed-batch*, para cada tiempo t (h).

La velocidad específica de consumo de metanol,  $\gamma_{\text{MetOH}}$ , ( $\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (g de metanol por g de biomasa y hora) se calculó mediante la expresión:

$$\gamma_{\text{MetOH}} = Q_{\text{MetOH}} / \int (XV) dt, \text{ entre } t \text{ y } t_0.$$

Siendo X, V y t, la biomasa ( $\text{g l}^{-1}$ ), el volumen de cultivo (l) y el tiempo (h), respectivamente, y  $Q_{\text{MetOH}}$  es la cantidad de metanol consumido (g), resultante de:

$$Q_{\text{MetOH}} = [[\text{MetOH}]_t - [\text{MetOH}]_{t_0}] V + v_{\text{MetOH}} \times 0.79$$

Donde  $[\text{MetOH}]$  es la concentración de metanol en el caldo de cultivo ( $\text{g l}^{-1}$ ), V el volumen de cultivo (l),  $v_{\text{MetOH}}$  el volumen añadido (ml) de metanol entre los tiempos t y  $t_0$  y 0.79 la densidad del metanol ( $\text{g ml}^{-1}$ ).

## **1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1.3.1 PRODUCCIÓN DE LA ROL por *P. pastoris* : DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO Mut (*Methanol utilisation*) Y CULTIVO EN MEDIO SINTÉTICO: CULTIVO A.**

La cepa de *P. pastoris* X-33/ROL utilizada a lo largo de este trabajo fue cedida, para tal propósito, por S. Minning (Stuttgart, Alemania). Previamente al cultivo de la cepa en un medio de composición definida o medio sintético, se realizaron una serie de experimentos en *fed-batch*, utilizando un medio de cultivo complejo, igual que el descrito en Minning *et al.*, (1998). Se siguió la misma estrategia de operación en Minning *et al.*, (1998) para corroborar la capacidad de producción de la cepa. Se realizó una inducción con metanol durante 70 h obteniéndose una producción de ROL de aproximadamente  $25 \text{ U ml}^{-1}$  (datos no mostrados).

Por otro lado, S. Minning, (comunicación personal), había realizado estudios sobre la expresión de la ROL en *P. pastoris* (cepa X-33/ROL, Mut<sup>+</sup>) en cultivos en bioreactor con un medio de composición sintética, según un esquema de adición de metanol recomendado para una cepa Mut<sup>+</sup> (*Invitrogen Fermentation guidelines*). Sin embargo, estos experimentos resultaron en la inhibición del crecimiento celular, posiblemente como consecuencia de la acumulación de metanol dentro del bioreactor hasta niveles descritos como tóxicos para las células.

La diferencia del caudal de adición de metanol recomendado para cepas Mut<sup>+</sup>, con respecto a cepas Mut<sup>s</sup>, es considerable ( $10\text{-}15 \text{ ml l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y  $3\text{-}5 \text{ ml l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente) (*Invitrogen*

*Fermentation guidelines*). Esta diferencia de caudales de adición es proporcional a la respectiva capacidad metabólica de asimilación de este sustrato por cada una de las cepas. Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados de S. Minning, en este trabajo se llevaron a cabo una serie de experimentos preliminares con el propósito de corroborar el fenotipo de la cepa *P. pastoris* X-33/ROL respecto a la utilización del metanol.

Se realizaron cultivos en placa, y en erlenmeyer, con medio mínimo BMM (BMMH, para las cepas comerciales control GS115 y KM71 ( $Mut^+$  y  $Mut^s$ , respectivamente) y 0.5 % (v/v) de metanol como única fuente de carbono y sustrato inductor. Estos experimentos muestran que la velocidad de crecimiento de la cepa X-33/ROL, es superior a la de la cepa control  $Mut^s$  (KM71), aunque ligeramente inferior a la de la cepa control  $Mut^+$  (GS115), sobre todo en las primeras etapas del crecimiento (ver figura 1).

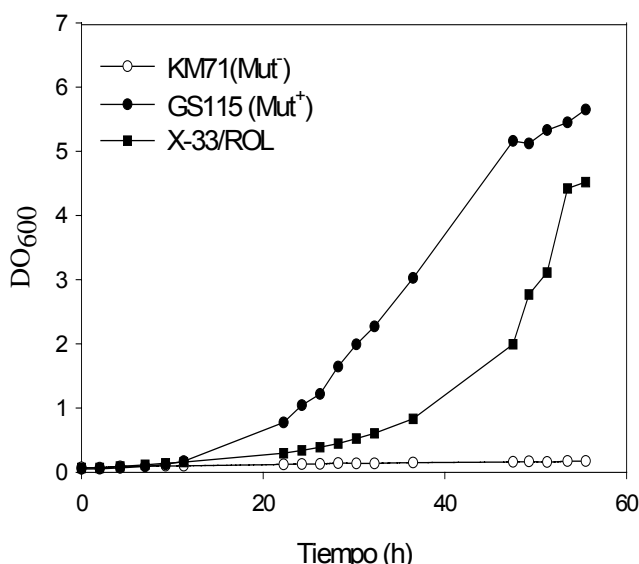


Figura 1. Curvas de crecimiento de las cepas control  $Mut^+$  y  $Mut^s$ , y la X-33/ROL de *P. pastoris* en medio mínimo BMM(H) con 0.5 % (v/v) de metanol.

Esta variación puede deberse a un posible efecto tóxico de la expresión de la ROL sobre el crecimiento celular, debido a la posible actividad fosfolipasa de la expresión recombinante de la enzima madura, como anteriormente ha sido citado en *E. coli* por Beer *et al.*, (1996).

Existen diversos trabajos descritos sobre la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* cuya expresión provoca un efecto aparentemente tóxico sobre la célula hospedadora  $Mut^+$ . Este efecto se traduce en una disminución de la velocidad de crecimiento de la cepa. En estos casos, se han conseguido niveles de producción más elevados, incluso en comparación a los obtenidos utilizando cepas  $Mut^s$ , mediante la disminución de la velocidad de adición del metanol (atenuando así el  $P_{AOX1}$ ) (Brierley *et al.*, 1990). Así pues, bajo los resultados observados por S. Minning (comunicación personal) y los mostrados en la figura 1, se optó, en un primer intento de producción de ROL en bioreactor utilizando un medio sintético, por un

esquema de adición de metanol conservador, es decir, recomendado para cepas Mut<sup>S</sup> (*Invitrogen Fermentation guidelines*).

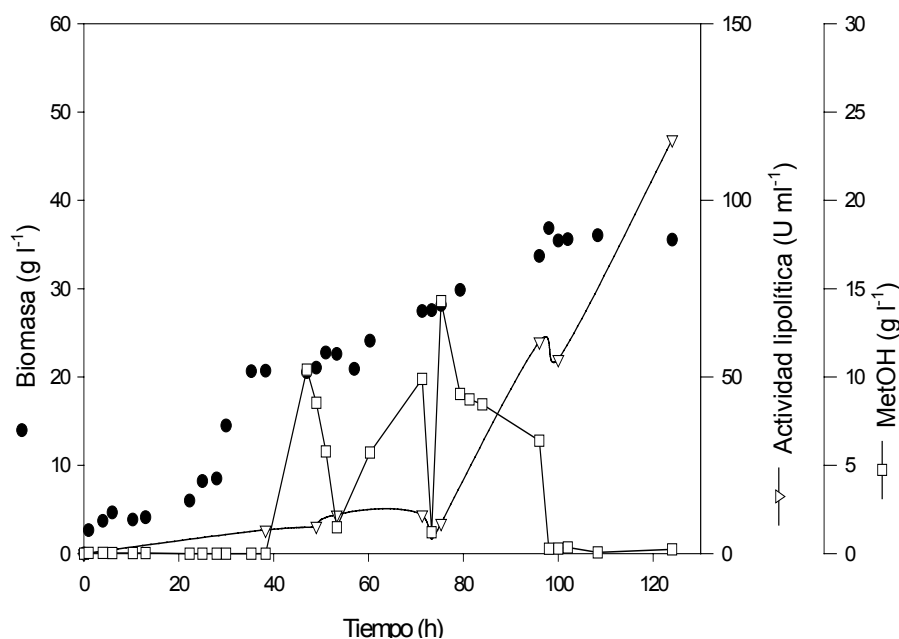
Se realizó una primera etapa de cultivo en *batch* con 40 g l<sup>-1</sup> de glicerol para obtener biomasa. Treinta minutos después de haberse consumido el glicerol (identificado por un rápido aumento en el valor del oxígeno disuelto, y comprobación por análisis de la concentración de glicerol mediante *HPLC*) se inició la etapa de inducción con metanol a una velocidad de adición de 5 ml h<sup>-1</sup>. Esta adición se mantuvo constante durante dos horas con el propósito de adaptar las células a la presencia de esta nueva fuente de carbono. Los treinta minutos iniciales de no-alimentación se consideran necesarios para asegurar el consumo total del glicerol dentro y fuera de las células (*Invitrogen Fermentation guidelines*).

Después de este periodo, la velocidad de adición del metanol se incrementó en un 10% cada 30 minutos hasta llegar a una velocidad máxima de 15 ml h<sup>-1</sup>. La velocidad de adición se fue modificando según la lectura del valor del oxígeno disuelto en el caldo de cultivo. Cada incremento en el valor del oxígeno disuelto se interpretó como el agotamiento de la fuente de carbono en el medio, y por lo tanto se aumentó en un 10% el caudal de adición de metanol.

La evolución de las principales variables del cultivo, así como los perfiles de adición del metanol, se representa en la figura 2.

**CULTIVO A**

**a.**



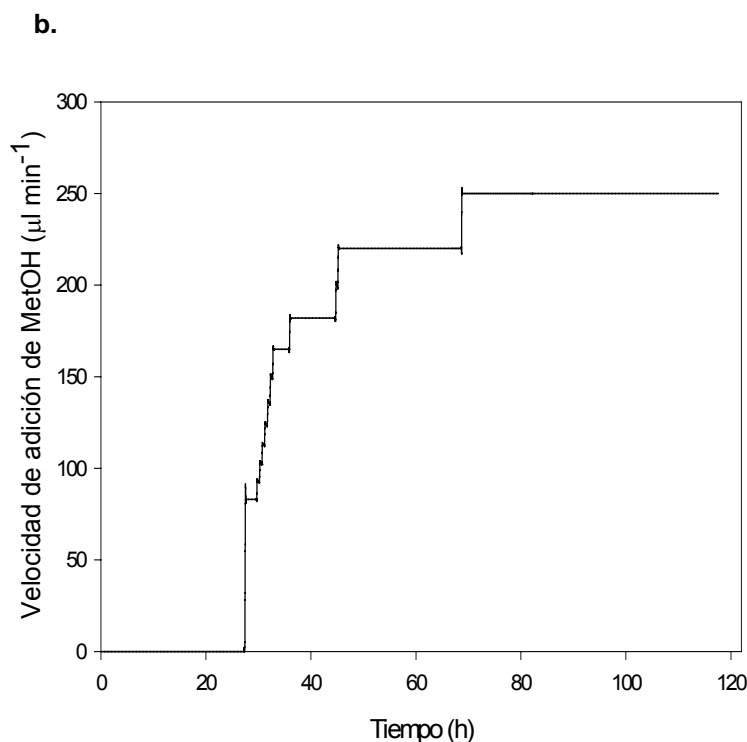


Figura 2. **a)** Representación de las principales variables de evolución del CULTIVO A ( $p\text{O}_2$ ). **b)** Perfil de la velocidad de adición del metanol a lo largo del CULTIVO A ( $p\text{O}_2$ ).  $p\text{O}_2$ : presión parcial del oxígeno.

Después de 120 h de cultivo, la actividad lipolítica detectada en el medio extracelular fue de  $120 \text{ U ml}^{-1}$ , la productividad fue de  $945 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y la productividad específica de  $26 \text{ U h}^{-1} \text{ l}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de biomasa. Los resultados de productividad de ROL más satisfactorios citados por Minning *et al.*, (1998), fueron de  $5435 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , después de 92 h de cultivo utilizando un medio de cultivo complejo. Sin embargo, se debe mencionar que estos resultados no son directamente comparables debido a diferencias en el ensayo enzimático utilizado. La determinación de la actividad de las enzimas lipolíticas depende de una serie amplia de factores directamente relacionados con el tipo de ensayo realizado, como por ejemplo el área interfacial del sustrato utilizado en el análisis (Thomson *et al.*, 1999).

Los valores de actividad lipolítica citados en este trabajo están bajo estimados respecto a los descritos en Minning *et al.*, (1998), debido precisamente al uso de un sustrato y un equipo distintos para el test de determinación de la actividad lipolítica. Esta diferencia se comprobó empíricamente analizando muestras únicas a través de ambos tests, y se estimó en un factor aproximado de tres veces inferior, en el test utilizado en este trabajo respecto al utilizado en Minning *et al.*, (1998).

Aplicando este factor de corrección, la productividad obtenida en el cultivo con medio sintético es aún aproximadamente un 50 % inferior a la obtenida en el cultivo con medio complejo.

Sin embargo, el posterior análisis por cromatografía de gases de la concentración de metanol de las muestras de cultivo extraídas durante la fase de inducción, revela que se alcanzaron

niveles de concentración de metanol transitorios descritos como tóxicos para el crecimiento celular (Swartz *et al.*, 1981) (figura 2.a). Entre las 40-80 h de cultivo, los valores de metanol detectados fueron aproximadamente de  $12 \text{ g l}^{-1}$ , por encima del límite de los  $5 \text{ g l}^{-1}$  bibliográficamente recomendados (Swartz *et al.*, 1981, Stratton *et al.*, 1998).

Elevados niveles de metanol provocan la generación de concentraciones elevadas de metabolitos de naturaleza tóxica para la célula, como el formaldehído, el ácido fórmico o en su forma ionizada, el formato, cuya acumulación puede resultar hasta 100 veces más perjudicial para la viabilidad de la célula que el metanol *per se*. La entrada del metanol al interior celular es libre, y su oxidación a formaldehído no está inhibida por producto, es decir, tanto el flujo de metanol, como la generación del formaldehído, son procesos que no se regulan de forma activa, por lo que es necesario una rápida eliminación de estos subproductos tóxicos (Jones *et al.*, 1991).

Además, una gran cantidad de formaldehído en el interior de la célula puede llegar a provocar la inactivación de la enzima alcohol oxidasa (AOX), que acaba por desasociarse de su grupo prostético FAD, y puede provocar la muerte celular (Veenhuis *et al.*, 1983). Sin embargo, cuando existen elevadas concentraciones de formaldehído y ácido fórmico en el interior celular, estos substratos acaban por excretarse al medio extracelular, donde también, a partir de determinados niveles, pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre el crecimiento debido a que pueden afectar directamente a las proteínas de la pared celular. Tanto el formaldehído, como el ácido fórmico, pueden actuar sobre las uniones peptídicas de las proteínas de la pared celular, al unirse a grupos de lisinas, y pueden provocar la desintegración de las secuencias fosfolipídicas, lo que provoca una parada en el crecimiento celular (Swartz *et al.*, 1981, Jones *et al.*, 1991).

Hay que remarcar que este efecto inhibitorio tan sólo se observa a concentraciones elevadas de estos compuestos. En concreto, en la levadura metilotrófica *H. polymorpha*, se determinaron unas concentraciones de formaldehído y ácido fórmico inhibitorias para el crecimiento celular de  $0.4 \text{ g l}^{-1}$  y  $0.2 \text{ g l}^{-1}$  respectivamente, provocadas a partir de concentraciones de metanol superiores a los  $6.5 \text{ g l}^{-1}$  en el medio de cultivo (Swartz *et al.*, 1981).

Por lo tanto, a pesar de no disponer de los valores de la concentración de estos substratos en el caldo del CULTIVO A es posible que, a concentraciones de metanol de  $12 \text{ g l}^{-1}$  se produzcan algunos de estos efectos tóxicos. Recientemente se ha correlacionado este efecto inhibitorio, en *P. pastoris*, a partir de concentraciones de metanol de  $7 \text{ g l}^{-1}$  (Kobayashi *et al.*, 2000). Además, estos niveles de metanol, podrían estar relacionados con la parada de los valores de biomasa que se observa en la figura 2.a, debido a los efectos tóxicos descritos anteriormente. Por otro lado, elevadas concentraciones de metanol también ejercen un efecto negativo sobre los niveles de transcripción iniciados por el promotor del gen *AOX1*,  $P_{AOX1}$ , los cuales son de 3

a 5 veces superiores en condiciones de crecimiento con concentraciones limitadas de metanol respecto a los alcanzados durante el crecimiento celular en exceso de metanol (Cregg *et al.*, 1993).

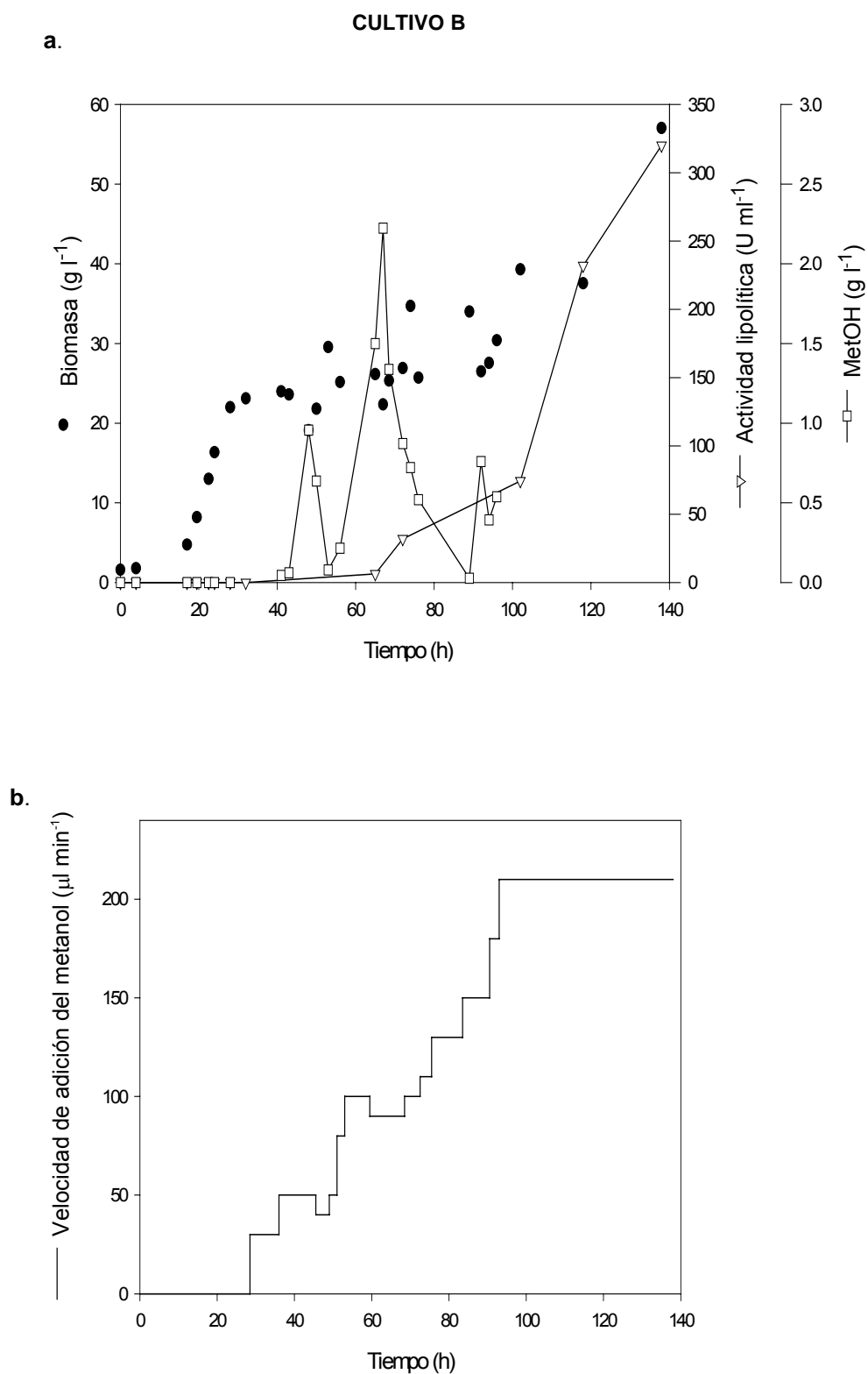
Así pues, mantener la concentración de metanol en el cultivo por debajo de unos niveles tóxicos parece ser necesario para la mejora de la producción del sistema. Los resultados obtenidos indican que el seguimiento de la evolución del oxígeno disuelto en el medio de cultivo, como aproximación de la evolución metabólica del mismo, no parece ser un parámetro fiable para tal propósito. Se requiere de una medida directa de la concentración de metanol en el medio a lo largo del proceso. Existen equipos específicos de monitorización y control de la concentración de metanol para cultivos de *P. pastoris* (*PTI Instruments, Tracer*, por ejemplo). No obstante, como primera aproximación ante la falta del equipamiento necesario, se optó por trabajar analizando las muestras de cultivo mediante cromatografía de gases, de forma prácticamente en línea.

### **1.3.2 SEGUIMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE METANOL EN LA ETAPA DE PRODUCCIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES: CULTIVO B.**

Se realizaron experimentos de cultivo siguiendo un esquema de trabajo idéntico al del CULTIVO A ( $pO_2$ ), a excepción de la estrategia escogida para la determinación del caudal de metanol a añadir durante la etapa de inducción. Así pues, en lugar de basar la adición del substrato inductor según el valor de la presión parcial del oxígeno disuelto durante el crecimiento celular ( $pO_2$ ), se determinó la concentración de metanol en el caldo de cultivo a través de análisis periódicos por cromatografía de gases (CG) de muestras extraídas directamente del cultivo.

La facilidad para la extracción de las muestras del bioreactor y la rapidez del análisis permiten, en función de la concentración de metanol detectada, la modificación de la velocidad de adición del metanol prácticamente en tiempo real.

La evolución de los principales parámetros de un cultivo realizado bajo estas condiciones, junto al perfil de adición de metanol utilizado, se muestra en la figura 3.





Con esta nueva estrategia, la concentración de metanol en el caldo de cultivo nunca superó los  $2.5 \text{ g l}^{-1}$ , trabajando dentro de un rango de concentración óptimo para la producción (Swartz *et al.* 1981, Stratton *et al.*, 1998) y evitándose además el efecto indeseable de elevadas concentraciones de metanol. Sin embargo, durante dos periodos, a las 55 y a las 90 h de cultivo, el consumo de metanol fue superior a la velocidad de adición del mismo, llegando a una concentración de metanol de cero en el caldo de cultivo. El metanol tiene un efecto inductor real sobre la regulación de la expresión del  $P_{AOX1}$  (Eggeling *et al.*, 1980), lo que significa que la ausencia de éste reduce los niveles de expresión de la proteína.

La actividad lipolítica final alcanzada ( $320 \text{ U ml}^{-1}$ ) y la productividad ( $2318 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) superaron en un factor de 2.5 las obtenidas en los cultivos previos (CULTIVO A,  $pO_2$ ), y la productividad específica ( $40.6 \text{ U h}^{-1} \text{ l}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) se incrementó en un factor de 1.6 respecto al mismo.

A pesar de ello, y como se observa en la figura 3.a., la actividad lipolítica extracelular no se detecta en el cultivo antes de las 40 h de iniciarse la etapa de *fed-batch* (aproximadamente 70 h de cultivo). Durante este periodo de tiempo prácticamente tampoco se produce incremento en el valor de biomasa alcanzada. Este hecho sugiere una ausencia de fijación de la fuente de carbono hacia material celular y/o proteína, y dado que existe disponibilidad de metanol (sin llegar a acumulaciones excesivas que resultan perjudiciales), esta parada en el crecimiento celular y en la producción de proteínas, podría deberse a una falta de energía. La utilización de substratos mixtos combinados con el metanol (a concentraciones limitantes del segundo substrato, para que no se describan efectos inhibitorios sobre la expresión de la proteína heteróloga) podría solventar esta supuesta falta de energía.

Existen varios ejemplos de cultivos de producción con levaduras metilotróficas, como *H. polymorpha*, *P. pinus*, *C. boindii* y *P. pastoris*, en los que se ha descrito un aumento del rendimiento celular biomasa-substrato en metanol mediante la adición del metanol combinado con otras fuentes de carbono a concentraciones limitantes (Müller *et al.*, 1986). Además, se ha observado que la adición de substratos mixtos aumenta la velocidad de consumo del metanol y se obtiene una mayor productividad final del sistema (Chirovulu *et al.*, 1997, Katakura *et al.*, 1998).

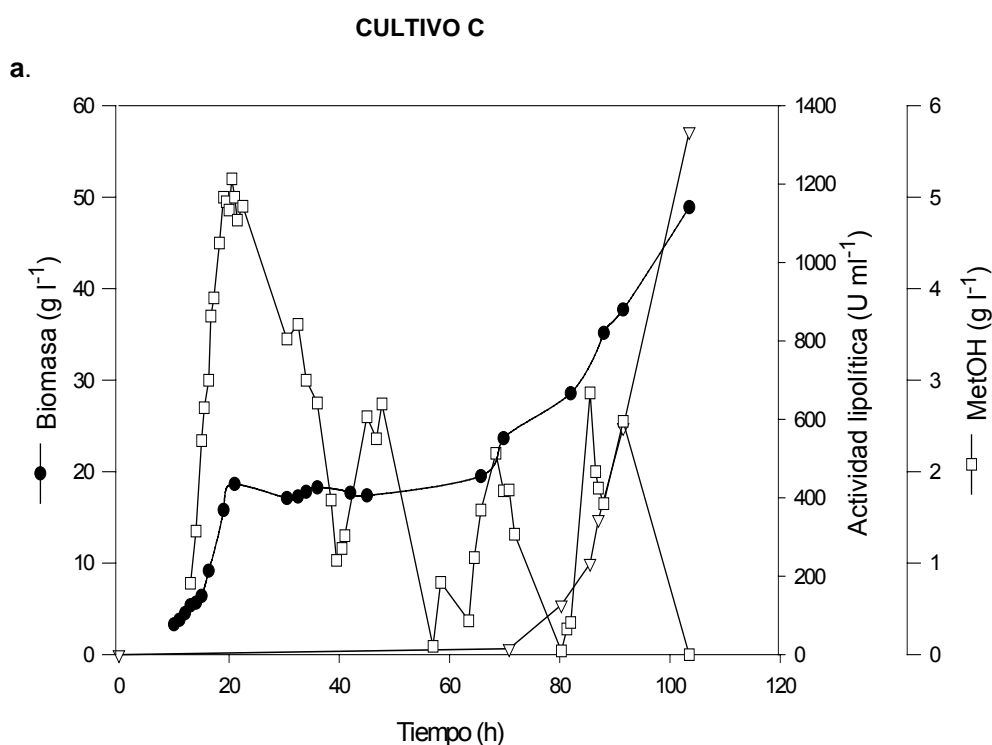
Los siguientes experimentos se diseñaron introduciendo una etapa de cultivo, previa al inicio del *fed-batch* de metanol, en la que se utilizó una combinación de substratos metanol/glicerol con el propósito de proporcionar una fuente de carbono y energía más rica al sistema e, igualmente, adaptar las células a la presencia del metanol en etapas previas a la de inducción.

**1.3.3 ESTRATEGIA DE ADICIÓN DE SUBSTRATOS MIXTOS GLICEROL-METANOL: CULTIVO C.**

En esta serie de experimentos se incorporó una etapa de transición, entre la etapa de *batch* y la de *fed-batch*, que consiste en la adición simultánea de los substratos glicerol y metanol. Esta fase de transición se implementó basándose en el esquema de adición de substratos mixtos descrito por Katakura *et al.*, (1998) para la producción del dominio V de la B2-glicoproteína humana en una cepa de *P. pastoris* Mut<sup>+</sup>.

Con el propósito de mantener comparable la cantidad de glicerol empleada en los experimentos anteriormente descritos, se realizó la fase inicial de cultivo en *batch* con una concentración de tan sólo de 20 g l<sup>-1</sup> de glicerol. La fase de transición se introdujo durante el periodo de crecimiento exponencial del cultivo, utilizando una velocidad de adición y una proporción de ambos substratos variable (ver materiales y métodos 1.2.6, página 34), hasta alcanzar una concentración final de 40 g l<sup>-1</sup> de glicerol.

Una vez finalizada la fase de transición, detectada por el inicio en el consumo del metanol, la velocidad de adición del metanol se ajustó según los valores de la concentración de éste obtenidos por cromatografía de gases, tal y como se realizó en el CULTIVO B (CG). La figura 4 representa las variables analizadas en este cultivo y el perfil de adición de metanol.



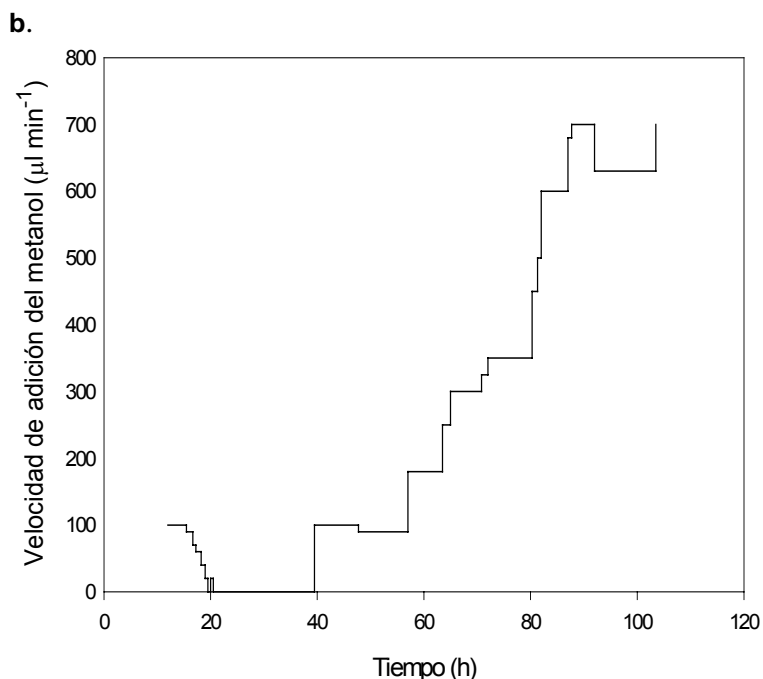


Figura 4. **a)** Representación de las principales variables de la evolución del CULTIVO C (CG+T). **b)** Perfil de la velocidad de adición del metanol en el CULTIVO C (CG+T). **GC +T**: cromatografía de gases y etapa de transición.

Después de 103.5 h de crecimiento, la actividad lipolítica detectada en el medio de cultivo fue de  $1334 \text{ U ml}^{-1}$ . Este valor nos lleva a una productividad final de  $12888 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  de ROL, debido a la reducción del tiempo operacional, y a una productividad específica de  $268 \text{ U h}^{-1} \text{ l}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de biomasa.

Durante la fase de transición, la adición del metanol se inició a mitad de la fase exponencial de crecimiento en glicerol. Sin embargo, durante este periodo, el metanol se acumuló en el medio hasta alcanzar una concentración máxima que no superó los  $5 \text{ g l}^{-1}$  e igualmente se aseguró la presencia de metanol cuando la concentración de glicerol llegó a niveles limitantes en el cultivo celular. Tan pronto el glicerol fue totalmente consumido, los microorganismos empezaron a consumir metanol a una velocidad muy superior a la observada en los cultivos anteriores.

Este hecho parece estar relacionado con las diferencias observadas en la comparación de los caudales de adición de metanol durante el *fed-batch* para cada una de las estrategias de adición realizadas. En el CULTIVO C, a pesar de tener un mayor caudal de adición de metanol, existe una menor acumulación del mismo en el medio extracelular, lo que indica un mayor consumo de éste (ver figura 5).

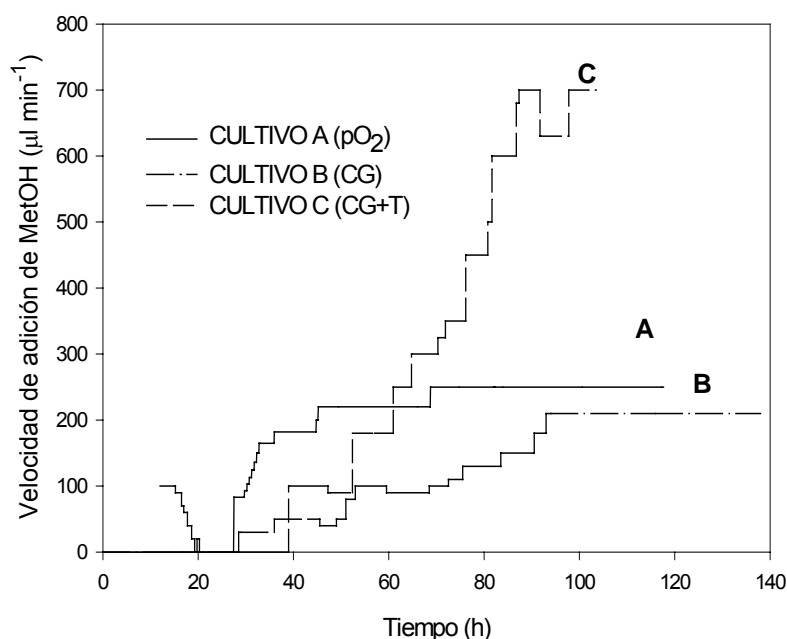


Figura 5. Perfil de la velocidad de adición de metanol durante el *fed-batch* de los CULTIVOS A, B y C. **pO<sub>2</sub>**: estrategia basada en la presión parcial del oxígeno disuelto. **CG**: estrategia basada en los valores de metanol obtenidos por cromatografía de gases. **GC+T**: estrategia basada en la cromatografía de gases y en una etapa de transición en la que se alimenta glicerol y metanol.

En resumen, mediante esta estrategia (CULTIVO C) se consiguió: una reducción del tiempo operacional de 20 h, incrementar en un factor de 11 la actividad lipolítica final obtenida y en un factor de 10.3 la productividad específica, con respecto a la primera de las estrategias estudiadas basada en el seguimiento del valor del oxígeno disuelto (CULTIVO A, pO<sub>2</sub>). Estos valores se recogen en la tabla 1 en forma de resumen.

CULTIVO	Composición del medio	Estrategia del <i>fed-batch</i>	X (g l <sup>-1</sup> )	Producción (U ml <sup>-1</sup> )	Productividad (U h <sup>-1</sup> l <sup>-1</sup> )	Product. esp (U h <sup>-1</sup> l <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )
A	Sintético	pO <sub>2</sub>	38	120	945	26
B	Sintético	C.G.	55	320	2318	40.6
C	Sintético	C.G + T	48	1334	12888	268

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos mediante las diferentes estrategias de cultivo en *fed-batch* ilustradas en los ejemplos: CULTIVOS A, B y C. **pO<sub>2</sub>**: presión parcial del oxígeno disuelto. **GC**: cromatografía de gases. **T**: etapa de transición.

Asimismo, se puede calcular la producción de ROL en el CULTIVO C (1334 U ml<sup>-1</sup>) bajo las condiciones del test de determinación de la actividad lipolítica descritas por Minning *et al.*, (1998), es decir, aplicando el factor de corrección entre ambos tests. En este supuesto, en el CULTIVO C se obtiene, aproximadamente, una producción de 3601800 U l<sup>-1</sup>, la cual,

asumiendo una actividad específica similar a la citada en Minning *et al.*, (1998) ( $8571 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína), equivale a una producción final de, aproximadamente, 400-450 mg de lipasa activa por litro de caldo de cultivo, en el CULTIVO C. La producción máxima citada en Minning *et al.*, (1998) utilizando un medio complejo fue de  $500000 \text{ U l}^{-1}$ , equivalente a 60 mg de lipasa activa por litro de cultivo.

Sin embargo, en el CULTIVO C, aún habiendo reducido levemente la etapa en la que no se detecta actividad lipolítica extracelular durante el *fed-batch*, aún existe un retraso considerable en la aparición de ésta. Este hecho es común en las tres series de cultivos realizados medio sintético (ver CULTIVOS A, B y C) a diferencia de lo observado en los cultivos realizados en medio complejo (Minning *et al.*, 1998). Este retraso en la aparición de la ROL en el medio extracelular parece ir asociado a una parada en los valores de biomasa detectados durante las primeras etapas de la fase *fed-batch*, que no se observa tan evidentemente en los cultivos en los que se utiliza medio complejo.

Dado que las concentraciones de metanol en el caldo de cultivo no superan los  $5 \text{ g}^{-1} \text{ l}^{-1}$ , esta parada de la biomasa no parece deberse al posible efecto tóxico provocado por la acumulación de formaldehído o ácido fórmico. Posiblemente, estas pequeñas diferencias se deben a la composición de los medios de cultivos *per se*. Es decir, la composición del medio complejo (rico en proteínas y vitaminas) proporciona un mayor aporte energético que el crecimiento en presencia de medio mínimo y metanol (Cregg *et al.*, 1993, Clare *et al.*, 1991, Boze *et al.*, 2001).

Además, la utilización del metanol supone la síntesis de las enzimas específicas (AOX, catalasa, FMD, FLD, DHAS etc), algunas de las cuales se sintetizan hasta elevados niveles (30% de proteína total para AOX, 15 % para FLD, por ejemplo), lo cual supone una carga energética para la célula. En presencia del metanol, también se induce la expresión de la ROL, que igualmente requiere de la síntesis *de novo* de precursores de la lipasa (aminoácidos) y está asociada a todo el mecanismo de secreción de las proteínas. Todos estos procesos están favorecidos en un medio complejo, donde la concentración de substratos (vitaminas y aminoácidos, precursores de la síntesis de proteínas) es mayor respecto a la de un medio sintético.

Por otro lado, y como se ha mencionado anteriormente, el fenotipo de esta cepa respecto a la utilización del metanol no es el típico de una cepa  $\text{Mut}^+$  (ver figura 1, página 37), por lo que se elaboraron una serie de experimentos para estudiar el posible efecto que la expresión de la lipasa podría ejercer sobre el crecimiento celular de la cepa.

**1.3.4 EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LA LIPASA SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR Y EL CONSUMO DE METANOL: CULTIVO D.**

Para examinar el posible efecto de la expresión de la ROL en *P. pastoris* sobre el crecimiento celular se llevaron a cabo una serie de cultivos de producción, tanto a pequeña escala (erlenmeyer), como en bioreactor. El diseño de los cultivos al nivel de erlenmeyer se basó en la utilización de un medio mínimo con sorbitol como fuente de carbono y 0.2 % de metanol como sustrato inductor. El sorbitol está descrito por varios autores como sustrato no represor de la utilización del metanol, y por lo tanto, no represor del  $P_{AOX1}$  (Sreekrishna *et al.*, 1997, Thorpe *et al.*, 1999).

Así pues, el crecimiento en presencia de ambos sustratos, sorbitol más metanol, permite evaluar el efecto directo de la expresión de la ROL sobre la cepa X-33/ROL, en comparación al crecimiento en los mismos sustratos de una cepa salvaje control X-33. La figura 6 representa las curvas de crecimiento de ambas cepas, la X-33/ROL y la salvaje X-33, en sorbitol como única fuente de carbono y bajo condiciones de inducción de la ROL, es decir, en presencia de sorbitol y metanol.

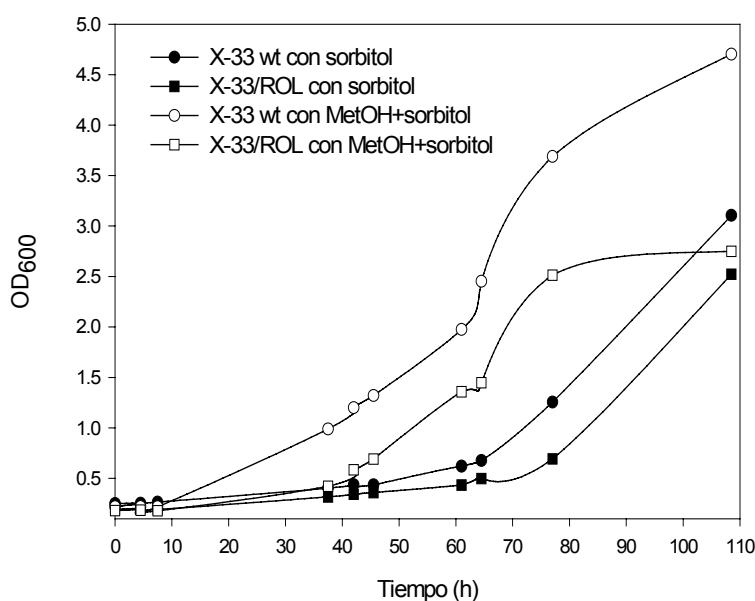


Figura 6. Curvas de crecimiento del cultivo en erlenmeyer, con metanol+sorbitol o tan sólo sorbitol, de la cepa productora de la ROL (X-33/ROL) y la salvaje X-33

Los cultivos realizados con ambos sustratos (sorbitol y metanol) alcanzan un valor de la  $DO_{600}$  superior a los realizados tan sólo con sorbitol, debido a la utilización de ambas fuentes de carbono a la vez. La densidad óptica alcanzada por la cepa X-33/ROL en metanol y sorbitol es inferior que la de la cepa salvaje X-33 (ver figura 6). No obstante, es difícil concluir en ninguna hipótesis debido a que los cultivos en erlenmeyer son especialmente variables.

Paralelamente, se diseñó un nuevo experimento de crecimiento en bioreactor, operando en *fed-batch* utilizándose una cepa control de *P. pastoris*, transformada con el mismo vector pPICZ $\alpha$ A, pero sin contener el gen de la ROL, X-33/pPICZ $\alpha$ A. El cultivo en *fed-batch* con esta nueva cepa (CULTIVO D) se llevó a cabo siguiendo un esquema de adición de sustratos mixto (glicerol y metanol) idéntico al descrito para el CULTIVO C (CG+T). (ver figura 7).

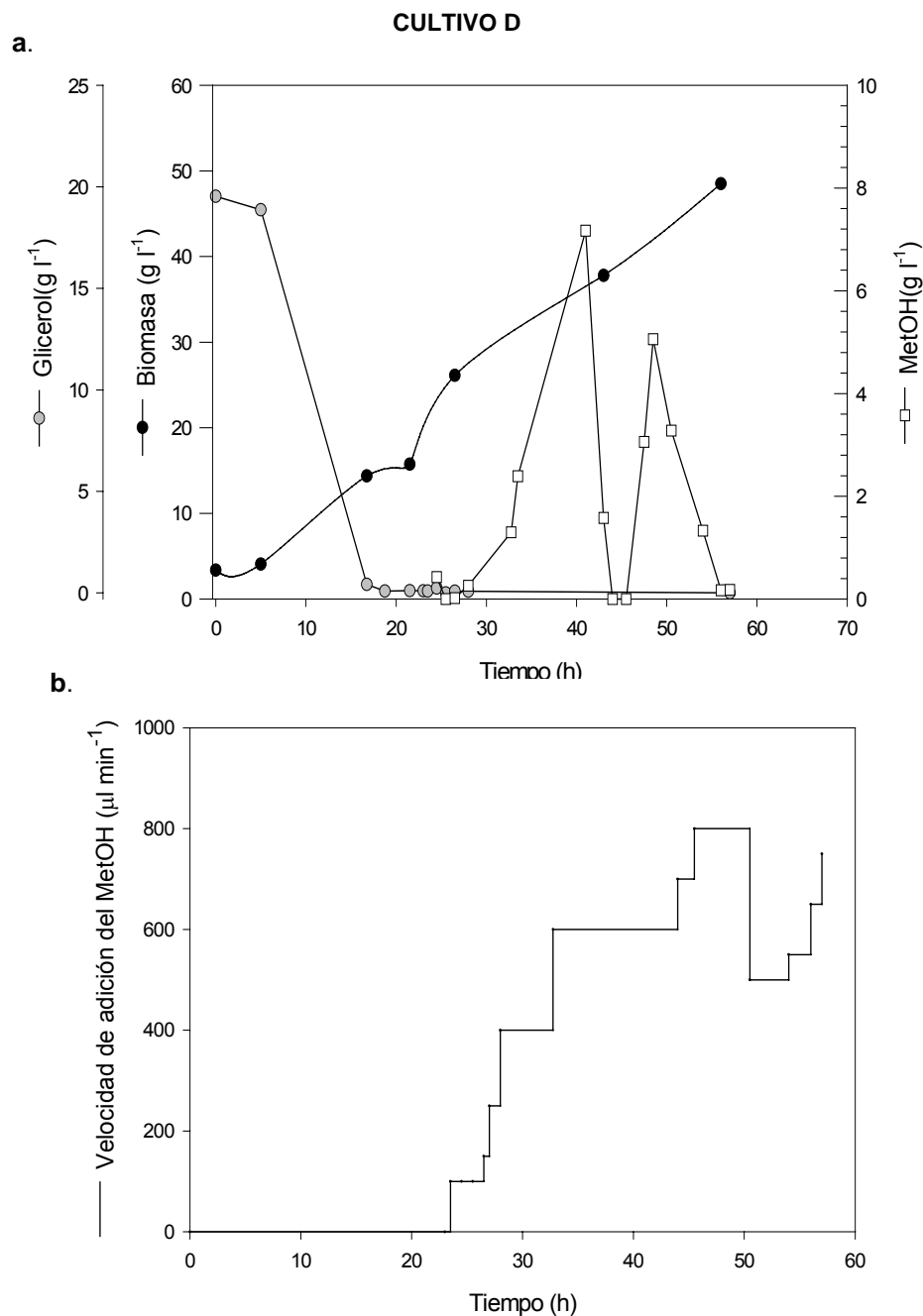


Figura 7. **a)** Representación de los parámetros principales de la evolución del CULTIVO D (control). **b)** Perfil de la velocidad de adición del metanol a lo largo del CULTIVO D (control).

Si comparamos la velocidad máxima de consumo de metanol alcanzada en estos cultivos, el de la cepa X-33/ROL (CULTIVO C; CG+T) y el de la X-33/pPICZ $\alpha$ A (CULTIVO D, control), obtenemos un valor máximo similar (8.5 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Sin embargo, existe un retraso considerable en el tiempo en el que se alcanza este valor en la cepa X-33/ROL (CULTIVO C; CG+T) (ver figura 8).

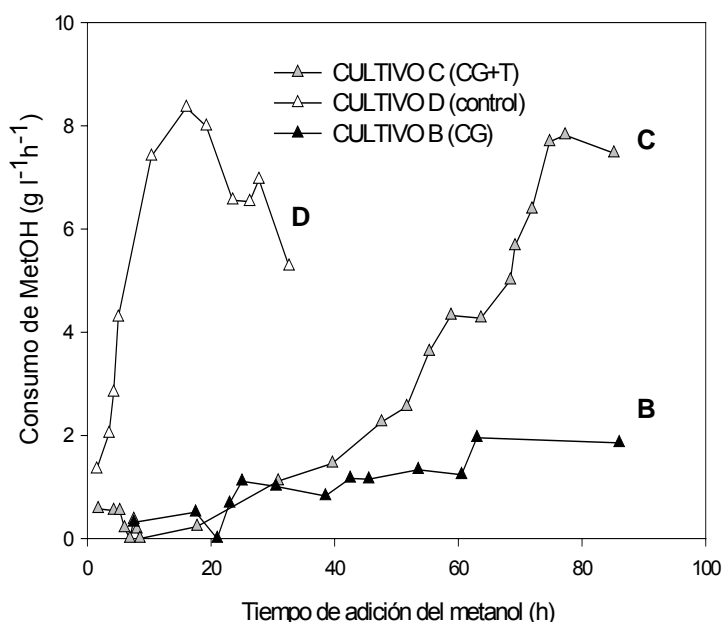


Figura 8. Representación de las velocidades de consumo de metanol en los CULTIVOS B, C y D. **CG**: cromatografía de gases. **T**: transición.

Por otra parte, la máxima velocidad de crecimiento calculada a la que se llega en ambos cultivos (C y D), durante la etapa de *fed-batch*, es comparable (aproximadamente 0.03 h<sup>-1</sup>), pero en el CULTIVO D (cepa control X-33/pPICZ $\alpha$ A) ésta se alcanza mucho antes, lo cual se correlaciona con los valores de consumo de metanol calculados (ver figura 8).

Estos experimentos sugieren que la expresión de la ROL podría afectar a la velocidad de asimilación del metanol durante el inicio de la fase de inducción en cultivos a elevada densidad celular, y por lo tanto, a la velocidad de crecimiento celular.

### 1.3.5 EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL RENDIMIENTO DE RECUPERACIÓN DE LA ROL RECOMBINANTE.

Se diseñó un protocolo de recuperación de la ROL a partir del caldo de cultivo, según se especifica en el capítulo 4 de la sección E de Resultados y Discusión de este trabajo (página 91), mediante el cual se obtiene un liofilizado final de la proteína, denominado extracto crudo de ROL. El análisis por SDS-PAGE de las muestras de extracto crudo de ROL obtenidas de los



cultivos realizados con medio sintético revela un mayor número de contaminantes que los que se detectan en las muestras crudas de ROL procedentes de cultivos realizados con medio complejo. La figura 9 muestra estas diferencias.

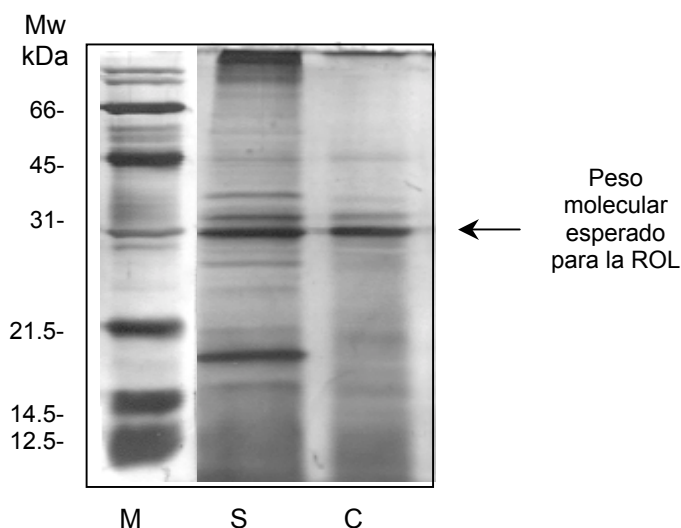


Figura 9. SDS-PAGE de las muestras de extracto crudo de ROL obtenidas de los cultivos realizados con **S**: medio sintético, **C**: medio complejo. **M**: marcadores de peso molecular de proteínas (kDa). La flecha en negro marca el peso molecular esperado de la ROL, 30 kDa. Tinción de plata.

En ninguno de los cultivos realizados con medio sintético (estrategias de los CULTIVOS A, B y C) se detectó actividad de proteasas, que pudieran justificar cierta degradación proteica. Sin embargo, la cepa X-33/ROL es isogénica respecto a la salvaje X-33, y al no haber adicionado peptonas ni casaaminoácidos al medio de cultivo sintético, no puede descartarse la existencia de niveles basales de proteasas endógenas que hubieran provocado una degradación parcial de la proteína. Por otro lado, niveles de biomasa alcanzados en los cultivos con medio sintético son mayores que se alcanzaron en los cultivos con medio complejo, por lo que puede ser que se haya dado un efecto mayor de lisis celular en estos cultivos de forma que se recuperen más contaminantes en el producto final, sobre todo en etapas finales del cultivo en las que incluso puede existir alguna limitación por nutriente.

Hay que destacar la presencia de una pequeña fracción de proteína alrededor de 32 kDa, por SDS-PAGE, en las muestras de extracto crudo de ROL obtenidas de cultivos en medio sintético (figura 9, carril S). Los análisis de esta banda, mediante digestión con *Endo H*, la identificaron como una fracción glicosilada, cuyo peso molecular desciende tras la desglicosilación hasta 30 kDa. Sin embargo, y a pesar que la ROL posee cuatro sitios potenciales de N-glicosilación, ésta no fue prácticamente detectada en las muestras obtenidas en cultivos con medio complejo (Mining *et al.*, 1998). No obstante, la secuencia N-terminal de la proteína mayoritaria correspondiente a la banda de peso molecular de 32 kDa no se corresponde con la de la ROL o con la de la proteína Pre-Pro- $\alpha$ -ROL. No existen estudios concretos sobre la glicosilación de

la ROL nativa. Sin embargo, recientemente, Hiol *et al.*, (2000), describieron una isoenzima de la ROL de 32 kDa con un grado de glicosilación muy bajo o inexistente.

Para acabar de comprobar alguna de estas observaciones sería necesario disponer de anticuerpos específicos contra la ROL, de forma que pudiera realizarse el análisis específico de estas proteínas por *immunoblot*, tanto previa como posteriormente a la desglicosilación.

## **1.4 CONCLUSIONES**

1. Se ha demostrado la importancia de mantener determinados niveles de metanol durante el proceso de inducción de la ROL expresada en *P. pastoris* con relación al rendimiento final obtenido en términos de productividad del sistema. Especialmente, asegurar concentraciones de metanol por debajo de  $5 \text{ g l}^{-1}$ , y superiores a  $0 \text{ g l}^{-1}$ , es una medida esencial en el incremento de la producción de la ROL en *P. pastoris*, bajo el  $P_{AOX1}$ .
2. El seguimiento del valor del oxígeno disuelto como indicador de la evolución del cultivo no es una estrategia fiable, sino que requiere de algún tipo de medida directa de la concentración de metanol en el bioreactor. El análisis de la concentración de metanol por cromatografía de gases, y la consecuente modificación del caudal de adición del substrato inductor, es una aproximación robusta para este propósito.
3. La introducción de una etapa de transición en el cultivo, en la que se alimenta conjuntamente glicerol y metanol, aumenta considerablemente la velocidad de consumo del metanol durante la posterior fase de inducción e incrementa la productividad específica del sistema. Estas mejoras operacionales conducen a una mayor producción final de lipasa en cultivos en *fed-batch* realizados en medio sintético respecto a la obtenida, con el mismo sistema de expresión, utilizando un medio complejo, el cual además es económicamente menos rentable.
4. Globalmente se pone de manifiesto la importancia de la optimización de las condiciones de cultivo sobre la productividad final del proceso, alcanzándose una producción final de, aproximadamente,  $420 \text{ mg}$  de ROL activa por litro de cultivo (frente a los  $60 \text{ mg l}^{-1}$ , citados en Minning *et al.*, (1998)).

5. Existe un retardo considerable en la aparición de actividad lipolítica extracelular en los cultivos realizados con medio sintético, posiblemente debido a cierto efecto de toxicidad por la expresión de la ROL madura sobre las células. Debido a este hecho, el esquema de adición de metanol lento, típico de cepas Mut<sup>s</sup>, durante la fase de inducción, parece ser el más adecuado.
  
6. El análisis por SDS-PAGE de las muestras de extracto crudo de ROL obtenidas de medio sintético revela la presencia de un mayor número de contaminantes que en las muestras procedentes de cultivos en medio complejo. Asimismo, estos resultados indican que existe un efecto real de las condiciones de cultivo sobre, no tan sólo la cantidad de proteína recombinante obtenida, sino también sobre la calidad del producto.



## CAPÍTULO 2. Efecto del aumento de la dosis génica heteróloga y del fenotipo celular Mut<sup>sl+</sup> en la expresión de una lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) en *Pichia pastoris*.

### 2.1 INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se ha estudiado cómo el diseño de diferentes estrategias de cultivo a elevada densidad celular permite aumentar la producción de una lipasa de *R. oryzae* (ROL) expresada en *P. pastoris* bajo el control del promotor P<sub>AOX1</sub>. No obstante, a parte de la definición de un determinado esquema operacional de cultivo, existen otros factores de tipo fisiológico o genético que pueden afectar los niveles de producción de las proteínas expresadas en *P. pastoris*. Dos de los más importantes son; el fenotipo celular de la cepa con respecto a la capacidad de asimilación del metanol (fenotipo Mut), y el número de copias del gen foráneo introducidas en el genoma de la célula hospedadora.

En concreto, con relación a la capacidad celular de asimilación del metanol, existen ejemplos en la bibliografía de niveles de producción comparables utilizando cepas de *P. pastoris* tanto Mut<sup>s</sup> como Mut<sup>+</sup> (Loewen *et al.*, 1997, Hochstrasser *et al.*, 1998, Abiodum *et al.*, 1999).

Sin embargo, las cepas Mut<sup>+</sup> se han referido frecuentemente como un sistema de expresión más adecuado para cultivos de elevada densidad celular, es decir, cuando se requieren grandes volúmenes de producción, debido a que las cepas Mut<sup>s</sup> requieren de periodos de cultivo mucho más largos. Este es el caso, por ejemplo, de la expresión de lisozima, el fragmento C de la toxina del tétanos, o más recientemente, la producción del fragmento C pesado de la neurotoxina responsable del botulismo, o la hormona de crecimiento humano, la cual se obtuvo en un 40% de la proteína total del sobrenadante (Digan *et al.*, 1989, Clare *et al.*, 1991, Potter *et al.*, 2000, Ecamilla *et al.*, 2000). Igualmente, las cepas Mut<sup>+</sup> son aparentemente más ventajosas en procesos de expresión de proteínas extracelulares debido a que la población de células en crecimiento constante es mayor, y la maquinaria de secreción de las proteínas se localiza precisamente en los extremos en los que se produce la gemación de la célula.

Sin embargo, para la expresión de determinadas proteínas, resultan más favorables velocidades de crecimiento más lentas, típicas de cepas Mut<sup>s</sup>. Por ejemplo, la producción de la enzima invertasa glicosilada alcanzada con una cepa Mut<sup>s</sup> es mayor que la que se obtiene en una cepa Mut<sup>+</sup> (Tschoop *et al.*, 1987). Asimismo, la utilización de una cepa hospedadora Mut<sup>s</sup>, en la expresión del antígeno de superficie de la hepatitis B, garantiza el ensamblaje correcto de las proteínas expresadas en las correspondientes partículas de 22 nm, lo cual no se consigue

con cepas Mut<sup>t</sup>, a pesar de que los niveles de producción de ambas cepas son comparables (Cregg *et al.*, 1987).

Además, el hecho de que las cepas Mut<sup>s</sup> no sintetizan grandes cantidades de alcohol oxidasa puede resultar ventajoso para la expresión heteróloga de determinadas proteínas, debido a que tanto la síntesis de la alcohol oxidasa, como la de la proteína foránea en cuestión, dependen del mismo sustrato inductor (Sreekrishna *et al.*, 1989). Igualmente, otra característica favorable de la utilización de cepas Mut<sup>s</sup> es el hecho de que son más tolerantes a posibles cambios en la concentración de metanol residual en el medio de cultivo, y por lo tanto, a sus posibles efectos tóxicos. Asimismo, las cepas Mut<sup>s</sup> responden más adecuadamente a estrategias de cultivo mixtas, es decir, con combinación de sustratos glicerol-metanol, lo que permite incrementar la velocidad específica de consumo del metanol y, en algunos casos, la productividad final del sistema (d'Anjou *et al.*, 2001).

No obstante, no existen unas pautas estrictas para la elección del fenotipo Mut de la célula hospedadora en un proceso de expresión heteróloga en *P. pastoris*, sino que los resultados obtenidos parecen ser particulares para cada proteína en cuestión. Al mismo tiempo, uno u otro fenotipo puede resultar más o menos favorable en relación con el número de copias del gen foráneo introducidas en el genoma celular. Este último es otro de los principales parámetros que pueden afectar el proceso de producción.

En relación con el efecto de la dosis génica heteróloga, existen diversos trabajos en los que la utilización de una cepa multicopia se traduce en un incremento en los niveles de mRNA en la célula y en una mayor producción de la proteína en cuestión. Sin embargo, el número óptimo de genes que aportan la máxima cantidad de mRNA o la máxima cantidad de proteína final parece ser particular de cada proteína (Thill *et al.*, 1990).

Algunos ejemplos en esta línea son la expresión intracelular del factor de necrosis tumoral en cepas Mut<sup>s</sup>, en las que se obtuvo una producción 200 veces mayor al aumentar el número de copias del gen a 20 (Sreekrishna *et al.*, 1989). Más recientemente, se ha referido un efecto igualmente positivo en los niveles de expresión intracelular del antígeno de superficie de la hepatitis B en cepas Mut<sup>s</sup> multicopia (Vassileva *et al.*, 2001).

La influencia del número de copias del gen en los niveles de producción alcanzados está más descrita para la expresión intracelular de proteínas, aunque no se limita a ésta. Por ejemplo, en Clare *et al.*, (1991), se cita el aumento, en un factor de 13, de la producción extracelular del factor de crecimiento de ratón en cepas Mut<sup>s</sup> que contienen hasta 19 copias del gen.

Por otro lado, incrementar el número de copias del gen a expresar puede tener distintos efectos según el fenotipo Mut de la célula de *P. pastoris* hospedadora. Por ejemplo, Clare *et al.*, (1991)

describe producciones similares del fragmento C de la toxina del tétanos utilizando cepas Mut<sup>s</sup> y Mut<sup>+</sup> que contienen una única copia del gen heterólogo. Sin embargo, al incrementar a catorce el número de copias del gen heterólogo en cepas Mut<sup>s</sup> la producción es seis veces mayor, mientras que en cepas Mut<sup>+</sup> es un 20% menor.

Es más, aumentar el número de copias del gen heterólogo en cuestión puede tener un efecto directo sobre la velocidad de crecimiento celular en metanol. Así, la utilización de cepas Mut<sup>+</sup> multicopia para la producción de la proteína trimérica CD40 se traduce en un cambio en la velocidad de crecimiento celular de la cepa hacia uno más típico de una cepa Mut<sup>s</sup> (Mc Grew *et al.*, 1997). Este hecho parece estar relacionado con la toxicidad de la proteína heteróloga expresada a elevados niveles. La atenuación del promotor del gen *AOX1*, mediante velocidades de alimentación del metanol bajas (típicas de una cepa Mut<sup>s</sup>), parece aumentar la producción en estos casos.

En la misma línea, Chen *et al.*, (2000), describe cómo la optimización de la producción de  $\alpha$ -galactosidasa A humana, a través de cepas Mut<sup>+</sup> multicopia, requiere la disminución de la temperatura de crecimiento de 30 a 25°C, obteniéndose, por lo tanto, una velocidad de crecimiento inferior más cercana a la descrita para cepas Mut<sup>s</sup>.

Bajo todas estas observaciones, resulta interesante llevar a cabo el estudio de la relación e influencia de estos dos parámetros en la producción de la lipasa ROL expresada en *P. pastoris*. En el presente trabajo se analiza el posible efecto del fenotipo celular Mut<sup>+/s</sup>, así como del número de genes *ROL* introducidos en el genoma de *P. pastoris*. Estos estudios se han llevado a cabo desde la obtención de las cepas en cuestión hasta la evaluación de los niveles de ROL obtenidos, tanto en cultivos en erlenmeyer, como en bioreactor, utilizando un medio sintético definido y metanol como fuente de carbono y substrato inductor.

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1 Cepas y vectores.**

Se utilizó el vector pPICZA $\alpha$ -ROL, construido por Minning *et al.*, (1998) (ver figura 1 en la página 31), para la generación de cepas ROL multicopia. Las cepas utilizadas fueron la X-33/ROL (Mut<sup>+</sup>) (S. Minning), y las comerciales GS115 (*HIS4*, Mut<sup>+</sup>) y KM71 (*HIS4*, Mut<sup>s</sup>) (*Invitrogen*).

### **2.2.2 Mantenimiento de cepas.**

Las cepas *P. pastoris* se mantuvieron temporalmente a 4°C en placas YPD (10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 20 g de dextrosa y 20 g de agar, por litro de agua destilada) con 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de Zeocina, y a largo plazo, en *glicerizados* con un 15% (*w/v*) de glicerol, a -70°C.

### 2.2.3 Transformación: obtención de competentes y condiciones de electroporación.

Se obtuvieron células de cada una de las cepas GS115 (*HIS4*, Mut<sup>+</sup>), GSR500\_3 (*HIS4*, Mut<sup>+</sup>) y KM71(*HIS4*, Mut<sup>s</sup>) y se transformaron por electroporación utilizando un equipo y condiciones de operación idénticas a las descritas en las páginas 31-32 del capítulo anterior.

### 2.2.4 Generación de cepas multicopia del gen *ROL*.

Para la generación de cepas multicopia se siguieron las recomendaciones de Higgins *et al.*, (1998). Se transformaron las cepas de *P. pastoris* GS115 y KM71 con el vector pPICZ $\alpha$ A-ROL linearizado en *SacI*. Se utilizaron 5  $\mu$ g de vector linearizado y 80  $\mu$ l de células competentes, en cubetas de 0.2 cm (*Bio Rad*). Las cepas transformadas se seleccionaron en placas de agar YPD con 100, 500, 1000 y 1500  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de Zeocina.

### 2.2.5 Comprobación de la dosis génica: *Southern Blot*.

#### 2.2.5.1 Extracción de DNA genómico.

Se realizó un cultivo de 50 ml de medio líquido YPD, a 30°C y 250 rpm, de cada una de las cepas transformantes escogidas, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 5-10. Se centrifugaron 10 ml del cultivo a 3000 rpm, durante 5 minutos, y se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de agua destilada estéril. Seguidamente, se realizó una siguiente centrifugación breve y se resuspendió el sedimento en 0.15 ml de medio SZB (2.3 ml de agua destilada estéril, 12.5 ml de sorbitol 2 M estéril, 2.5 ml de citrato de sodio 1 M estéril, 7.5 ml de EDTA (etilenediaminetetra-acetato disódico) 0.2 M estéril, 15 mg de enzima Zymoliasa (*Invitrogen*) y 0.2 ml de 2-mercaptoetanol). Las células se incubaron a 37°C agitando ocasionalmente hasta que >80 % de las células hubieran perdido la pared celular (observación de la lisis de la pared celular mediante suspensión en una gota de 5% de Triton X-100 y visualización por microscopía óptica). Los esferoplastos se lisaron mediante 0.15 ml de solución SDS-TE (5 ml 10 % (w/v) SDS (sodio dodecil sulfato), 2.5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8, 0.125 ml de EDTA 0.2 M y 17.4 ml de agua destilada estéril) y se incubaron a 65°C durante 10 minutos. Se precipitaron las proteínas y la debris celular mediante 0.15 ml de acetato de potasio 5 M incubando la muestra en hielo durante 45 minutos. Se centrifugó a 12000 xg durante 15 minutos y el DNA del sobrenadante se precipitó con acetato de potasio 5 M e isopropanol, a -20°C, durante 15 h. Posteriormente, se descongelaron las muestras y se centrifugaron a velocidad máxima (12000 xg) y a 4°C, durante 5 minutos, y se recuperó el sedimento disolviéndolo en 0.2 ml de agua destilada estéril. Se añadió 2  $\mu$ l de 10 mg ml<sup>-1</sup> de RNAsa A (*New England Biolabs*) incubándose a 37°C durante 10 minutos. Se añadieron 4  $\mu$ l de NaCl 5 M y 2  $\mu$ l de 20 mg ml<sup>-1</sup> de pronasa (proteasa de *Streptomyces griseus*, *Sigma*). Se realizó una incubación de la muestra a 37°C en un baño de agua durante 10 minutos. Se realizó una extracción de DNA mediante una solución de fenol saturado y fenol: cloroformo: alcohol isoamilo (25: 24: 1) sucesivamente. Se añadieron 20  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M, pH 5.3, y 2.5 volúmenes de etanol 100 %, a -20°C. Las muestras se incubaron 12 h a -20°C y, posteriormente, se centrifugó el DNA a máxima velocidad (12000 xg)



durante 10 minutos, a 4°C. El sedimento se disolvió en 20 µl de solución TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) mediante incubación a 65°C durante 3 minutos.

#### 2.2.5.2 Determinación de la concentración de DNA.

La pureza del DNA se determinó mediante absorbancia a 260 nm y 280 nm ( $Abs_{260}/Abs_{280}=1.8-2$ ) y la concentración según la relación: 1 unidad  $Abs_{260}= 50 \mu\text{g dsDNA}$ .

#### 2.2.5.3 Digestión enzimática del DNA genómico.

Se realizó una digestión de las muestras de DNA genómico con los enzimas *EcoRI* y *NotI*, que flanquean el gen *ROL*, durante 3 h a 37°C, según las especificaciones del suministrador (*Roche Diagnostics*). Se digirieron 3 µg de DNA de cada una de las muestras (calculados según 2.2.5.2).

#### 2.2.5.4 Construcción por PCR y marcaje de una sonda de DNA específica de ROL.

Se construyó la sonda de DNA complementaria al gen *ROL* por PCR (*Polymerase chain reaction*) bajo las siguientes condiciones: temperaturas de desnaturalización inicial 94°C (5 minutos), 30 ciclos a una temperatura de desnaturalización, hibridación y elongación de 94°C (1 minuto), 53°C (1 minuto) y 72°C (1 minuto), respectivamente, y 10 minutos finales de elongación a 72°C. Se utilizó el plásmido pPICZA $\alpha$ -*ROL* como DNA molde (100 ng), 1µl (a una concentración de 250 ng µl<sup>-1</sup>) de los oligonucleótidos comerciales 5'AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') y 3'AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') (*Invitrogen*), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, 1 µl de DMSO (dimetil sulfóxido), 1 µl de 10mM dNTPs (*dNTPs Nucleotid mix, Roche Biochemicals*) y 0.5 µl de DNA polimerasa *Expand High (Roche Diagnostics)* en un volumen final de 50 µl de reacción. El producto de PCR se marcó mediante el *Bio Prime DNA Labelling System (Life Technologies)*, que contiene nucleótidos marcados con el substrato biotina y utiliza la enzima *Klenow*. La determinación de la concentración de DNA de la sonda se realizó mediante comparación con una recta patrón de concentraciones conocidas de DNA, de 2.5, 5, 10 y 20 ng µl<sup>-1</sup>, mezcladas con 4 µl de Bromuro de Etidio (2 µg ml<sup>-1</sup>) e iluminando con luz UV.

#### 2.2.5.5 Electroforesis de DNA y preparación del gel de agarosa para southern.

Los geles para la visualización del DNA se realizaron a una concentración del 1 % (w/v) de agarosa en Tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM pH 8.30, EDTA 1 mM) y tampón de carga 6X (2.5 g l<sup>-1</sup> de azul de bromofenol, 2.5 g l<sup>-1</sup>, de cianol de xileno FF y 300 g l<sup>-1</sup> de glicerol). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron los *1 kb ladder (Life Technologies)*. La tinción de las bandas se realizó con una solución de Bromuro de Etidio (10 g l<sup>-1</sup>) durante 10 minutos previamente a la exposición del gel con luz UV. Para la transferencia del DNA genómico se realizó un gel de agarosa con las muestras a analizar, a un voltaje constante de 60 v durante 5 h. Se limpió el gel en agua destilada y se desnaturalizó por inmersión en una solución de NaCl 1 M, NaOH 0.5 M durante 2 x 20 minutos. Posteriormente, se neutralizó mediante inmersión en

Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5, NaCl 1.5 M durante 2 x 20 minutos. Por último, el gel se impregnó en tampón de transferencia SSC 10X (composición 1X, por litro de agua destilada: 175.3 g de NaCl, 88.2 g de citrato de sodio, pH 7.00).

### *2.2.5.6 Transferencia e inmovilización del DNA.*

La transferencia capilar del DNA se realizó sobre una membrana de *nylon* y solución de transferencia SSC 10X. Una vez realizada, se lavó la membrana en tampón SCC 5X, a 50°C, durante 5 minutos y se dejó secar a 70°C. La inmovilización se realizó mediante entrecruzamiento de las moléculas de DNA por exposición a luz UV.

### *2.2.5.7 Hibridación del DNA.*

La membrana se impregnó durante 1 h a 65°C con 10 ml de Na(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, pH 7.2 y 20 ml de tampón de hibridación (EDTA 0.5 M, 20% (w/v) SDS, Na(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.5 M). La sonda de DNA marcada con biotina se desnaturalizó a 100°C, 10 minutos, y a continuación se enfrió inmediatamente en hielo. Se utilizó unos 25 µl de solución de hibridación por cm<sup>2</sup> de membrana y unos 100 ng de sonda por ml de tampón de hibridación. La hibridación se llevó a cabo durante 24 h a 65°C. Posteriormente se realizaron lavados sucesivos en medio SSC 2X + 1% (w/v) SDS, SSC 0.25X + 1% (w/v) SDS, y SSC 1X.

### *2.2.5.8 Bloqueo de la membrana y revelado por quimioluminiscencia.*

Se realizaron dos lavados de la membrana, de 5 minutos cada uno, con 0.5 ml cm<sup>-2</sup> de membrana de solución de bloqueo: 0.6 g de *I-Block reagent*, 30 ml de PBS 10X (tampón fosfato salino, pH 7.4), 7.5 ml de 20 % (w/v) SDS. Se realizó un tercer lavado a una concentración de 1 ml cm<sup>-2</sup> de membrana, durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 10 ml de solución de bloqueo que contiene 2 µl del substrato *Avidex-AP* conjugado (*Life Technologies*) (diluido 1: 5000, en el mismo tampón), y se incubó la membrana durante 22 minutos a temperatura ambiente y agitación continua. Nuevamente, la membrana se lavó con la solución de bloqueo durante 5 minutos y se realizaron tres lavados más en PBS 1X y 0.5 % (w/v) SDS. Seguidamente, se realizaron dos lavados más, en el mismo tampón, de 2 minutos cada uno. La membrana escurrida se cubrió con una fina capa de substrato *CDP-star* (*Life Technologies*), utilizando la concentración de referencia de 3 ml 100 cm<sup>-2</sup>, y se incubó durante 5 minutos. Finalmente, la membrana se revela mediante exposición a una película de revelado, en cámara oscura, durante 6 h.

## **2.2.6 Medios de cultivo.**

### *2.2.6.1 Determinación del fenotipo Mut<sup>S/+</sup>.*

Para la determinación del fenotipo Mut se realizaron cultivos en placas MM y MD y en medio líquido BMM(H), cuya composición se especifica en la página 32 (apartado 1.2.4.1). Se realizaron cultivos de 250 ml de volumen, inoculados a partir de un pre-inóculo de 50 ml de

cultivo, en medio YPD (composición en 2.2.2, página 57) ( $DO_{600}$  final del pre-inóculo 2-6). Las condiciones de crecimiento fueron  $30^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm.

### 2.2.6.2 Selección de clones *his+*.

Para la selección de clones *his+* se utilizaron placas de medio mínimo MM, sin histidina, y MD. La composición de las mismas se especifica en la página 32 (en 1.2.4.1).

### 2.2.6.3 Cultivos de baja densidad celular.

A partir de cultivos en placa, se sembraron pre-inóculos de 50 ml de volumen en medio YPD que crecieron durante 24 h a  $30^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm. Posteriormente, se utilizaron los pre-inóculos para inocular 250 ml de medio rico tamponado BMGY (pH 6.0) (composición en 1.2.4.3, pág. 33), manteniéndose las mismas condiciones de crecimiento hasta alcanzar una  $DO_{600}$  final de 18-20. Los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm y las células se resuspendieron en 250 ml de medio mínimo tamponado BMM(H) (composición en 1.2.4.1, pág.32) con 0.5 % (v/v) de metanol como única fuente de carbono y sustrato inductor.

### 2.2.6.4 Cultivos de elevada densidad celular.

Se realizaron cultivos de elevada densidad celular operando con el *bioreactor Braun Biostat* ED bajo la modalidad de *batch* y *fed-batch*. Las condiciones de operación y la composición del medio de cultivo sintético fueron idénticas a las descritas en la página 33 (en 1.2.4.3).

Para los cultivos en *batch* se utilizó como inóculo la población celular crecida en un bioreactor de menor volumen de capacidad (*New Brunswick*, 1l) en medio complejo BMGY (con  $20\text{ g l}^{-1}$  de glicerol), con el propósito de alcanzar una mayor población celular inicial debido al bajo rendimiento biomasa-sustrato de la cepa en metanol. Este primer cultivo se centrifugó a 5000 rpm y se resuspendió en el medio mínimo (medio sintético, ver página 33 para su composición) con el que se realizó el *batch* de  $10\text{ g l}^{-1}$  de metanol y suplementado con  $0.4\text{ g l}^{-1}$  de histidina.

## 2.2.7 Métodos analíticos.

### 2.2.7.1 Biomasa.

La determinación de la biomasa se realizó mediante peso seco y seguimiento de la evolución de la  $DO_{600}$  (ver página 34, en apartado 1.2.7.1).

### 2.2.7.2 Análisis de la actividad lipolítica.

La actividad lipolítica se de las muestras de cultivo correspondientes a cultivos de elevada densidad celular se determinó, mediante valoración por pHSTATO como se especifica en la página 34 (en 1.2.7.2) del capítulo anterior. Para las muestras procedentes de cultivos en erlenmeyer se utilizó el test colorimétrico comercial LIP de *Roche Diagnostics* a  $30^{\circ}\text{C}$  y pH 8.10, según especificaciones del suministrador.

### 2.2.7.3 Análisis de la concentración de metanol y glicerol.

La concentración de metanol y glicerol se determinó mediante análisis por HPLC, según las mismas especificaciones descritas en la página 35 (en 1.2.7.3).

### 2.2.8 SDS-PAGE.

Los geles de poliacrilamida se realizaron al 12% (w/v) en condiciones desnaturalizantes, según se describe en la página 35 (en 1.2.9).

### 2.2.9 Cálculo de velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y de la velocidad específica de consumo del metanol ( $Y_{MetOH}$ ).

La velocidad de crecimiento en *batch* se obtiene de la expresión:

$$\mu X = dX/dt.$$

La velocidad específica de consumo de metanol,  $Y_{MetOH}$ , ( $g\ g_x^{-1}\ h^{-1}$ ) (g de metanol por gramo de biomasa y hora) se calculó mediante las expresiones detalladas en la página 36 (en apartado 1.2.11).

## **2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 2.3.1 GENERACIÓN DE CEPAS ROL-MULTICOPIA Mut<sup>+</sup> Y COMPROBACIÓN DE LA DOSIS GÉNICA.

La construcción de cepas multicopia se llevó a cabo según la metodología descrita en Higgins *et al.*, (1998), basándose en la utilización del gen de resistencia a Zeocina, contenido en el vector pPICZ $\alpha$ A-ROL. En el proceso de transformación de células competentes de *P. pastoris* se pueden incorporar múltiples copias del casete de expresión en el genoma celular mediante integraciones sucesivas del vector. Este fenómeno ocurre de forma espontánea en un 1-10 % de las transformaciones realizadas por electroporación (Higgins *et al.*, 1998). Así pues, la capacidad de ciertos clones de crecer a elevadas concentraciones de Zeocina es, por lo tanto, indicativo de la incorporación de múltiples copias del vector de expresión que contiene esta resistencia y el gen heterólogo a expresar.

En este trabajo, se seleccionaron un total de 19 clones de *P. pastoris* GS115 Mut<sup>+</sup> (transformadas con el vector pPICZ $\alpha$ A-ROL) resistentes a elevadas concentraciones de Zeocina aislados a partir de placas de medio sólido YPD con 100, 500, 1000 y 1500  $\mu g\ ml^{-1}$  de Zeocina. En la tabla 1 se detallan estos clones.

	CONCENTRACIÓN DE ZEOCINA DE SELECCIÓN			
	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$	500 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1500 $\mu\text{g ml}^{-1}$
CLONES (His <sup>-</sup> , Mut <sup>+</sup> )	GSR100_5	GSR500_1	GSR1000_1	GSR1500_1
		GSR500_2	GSR1000_2	GSR1500_2
		GSR500_3	GSR1000_3	GSR1500_3
		GSR500_4	GSR1000_4	GSR1500_4
		GSR500_5	GSR1000_5	GSR1500_5
		GSR500_6	GSR1000_6	GSR1500_6

Tabla 1. Clones hiperresistentes a Zeocina seleccionados en placa de medio sólido YPD con concentraciones de Zeocina de 100, 500, 1000 y 1500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

La selección de clones multicopia mediante hiperresistencia a Zeocina resulta más ventajosa que otras estrategias de obtención de cepas multicopia descritas para *P. pastoris*, en cuanto a manipulación y selección de los transformantes (Higgins *et al.*, 1998). Sin embargo, esta es una técnica que puede derivar en falsos positivos, y por lo tanto, requiere de la comprobación específica de la dosis génica mediante el análisis de hibridación del DNA. Debido a que la extracción de DNA genómico es una técnica laboriosa, se realizaron previamente cultivos en erlenmeyer para comprobar cuáles de estas cepas producían lipasa a un nivel superior al de la cepa control, y reducir así el número de clones a examinar mediante análisis de hibridación de DNA.

Se realizaron tres series de experimentos (I, II y III) utilizando 6 clones (de los especificados en la tabla 1) en cada experimento, más la cepa control X-33/ROL, se siguió la evolución de su crecimiento celular a través de la DO<sub>600</sub> y se tomaron muestras para analizar la actividad lipolítica en el medio mediante ensayo colorimétrico (kit de *Roche Diagnostics*, ver materiales y métodos 2.2.7.2 de este capítulo, página 61). En las tres series, se alcanzaron valores de DO<sub>600</sub> entre 40-50, pero tan sólo en una de las series se encontró un único clon cuya producción fuera superior al de la cepa control X-33/ROL. Los resultados de producción de esta serie, serie I, se recogen en la figura 1.

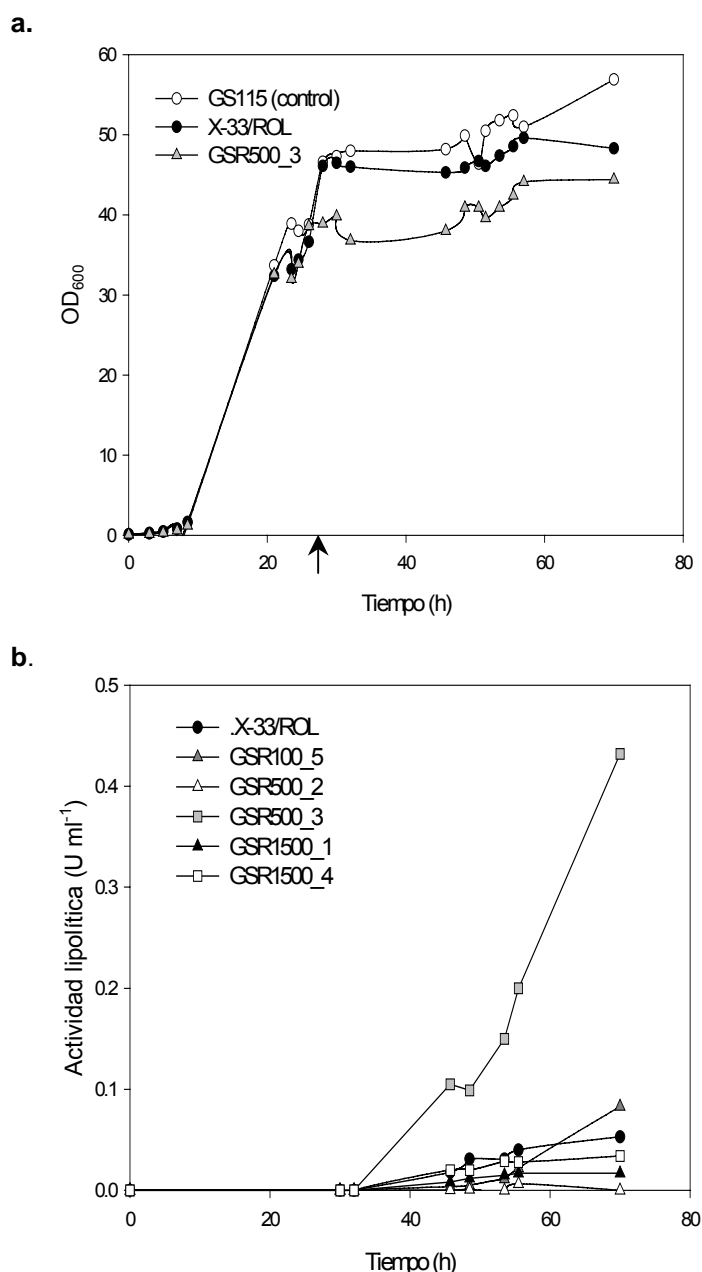


Figura 1. **a)** Representación de los niveles de actividad lipolítica de los clones Mut<sup>+</sup> seleccionados como ROL multicopia y de las cepas control X-33/ROL. y GS115. **GSR100\_5**: clon resistente a 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de Zeocina. **GSR500\_2** y **GSR500\_3**: clones resistentes a 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de Zeocina. **GSR1500\_1** y **GSR1500\_4**: clones resistentes a 1500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de Zeocina. **b)** Densidad óptica alcanzada por los cultivos control (GS115 y X-33/ROL) respecto a la cepa ROL multicopia GSR500\_3. Flecha en negro: cambio de medio BMGY a BMM (ver materiales y métodos, 2.2.6.3 de este capítulo).

De los 19 clones cultivados, tan sólo la cepa GSR500\_3 muestra un incremento en la actividad lipolítica detectada en el medio de cultivo respecto a la cepa control. La comprobación de la dosis génica, respecto al gen *ROL*, de la cepa GSR500\_3, se realizó mediante la hibridación del DNA del genoma celular de la cepa con una sonda específica para el gen *ROL* marcada con biotina ( ver figura 2.a).

La intensidad de la banda de 0.9 kb, correspondiente al tamaño molecular del gen *ROL* (figura 2.b), es proporcional al número de copias del gen detectada por la sonda específica. Las bandas superiores del carril 3, se deben a digestiones parciales de las secuencias en tándem de copias del gen *ROL*. La comparación de los carriles 2 y 3 de la figura 2.b (cepa X-33/*ROL* y cepa GSR500\_3) indica que la cepa GSR500\_3 contiene al menos 5 copias del gen *ROL*.

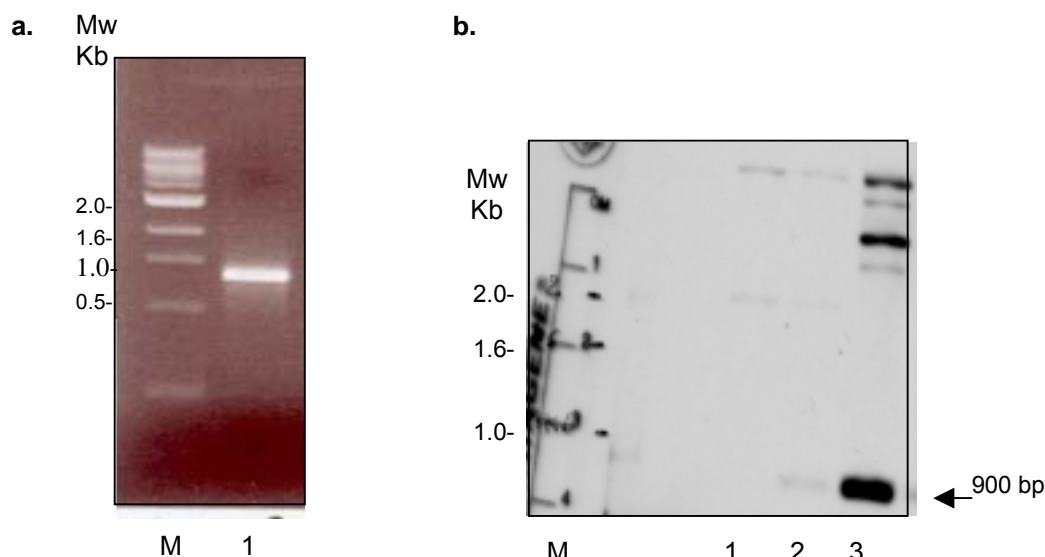


Figura 2. **a)**: Sonda del gen *ROL* generada por PCR, **M**: marcadores de DNA, **1**: producto de PCR. **b)**: Comprobación de la dosis génica por *southern blot*; **M**: marcadores de peso molecular de DNA, **1**: DNA genómico de la cepa control GSR115, **2**: DNA genómico de la cepa X-33/*ROL*, **3**: DNA genómico de la cepa GSR500\_3. Flecha en negro: tamaño molecular correspondiente a una única copia del gen *ROL*.

A pesar de los resultados obtenidos (respecto al incremento en la actividad lipolítica detectada), hay que tener en cuenta que los cultivos en erlenmeyer se caracterizan por no ser experimentos rigurosos debido a la falta de reproducibilidad de parámetros importantes para el crecimiento celular, como la aireación, el pH etc. El estudio preciso de la producción de *ROL* en la cepa multicopia GSR500\_3 debe llevarse a cabo en bioreactores, donde todos estos factores están monitorizados y controlados.

### 2.3.2 CULTIVO DE GSR500\_3 EN FED-BATCH: CULTIVO E

Se siguió el esquema de cultivo en *fed-batch* diseñado en el capítulo anterior (CULTIVO C, CG+T, páginas 44-45), que consta de una primera etapa de crecimiento celular en *batch* con 20 g l<sup>-1</sup> de glicerol, una etapa de transición intermedia en la que se alimentan ambos substratos (glicerol y metanol), más la etapa propia de inducción con metanol. La evolución de los principales parámetros del proceso se resume en la figura 3.

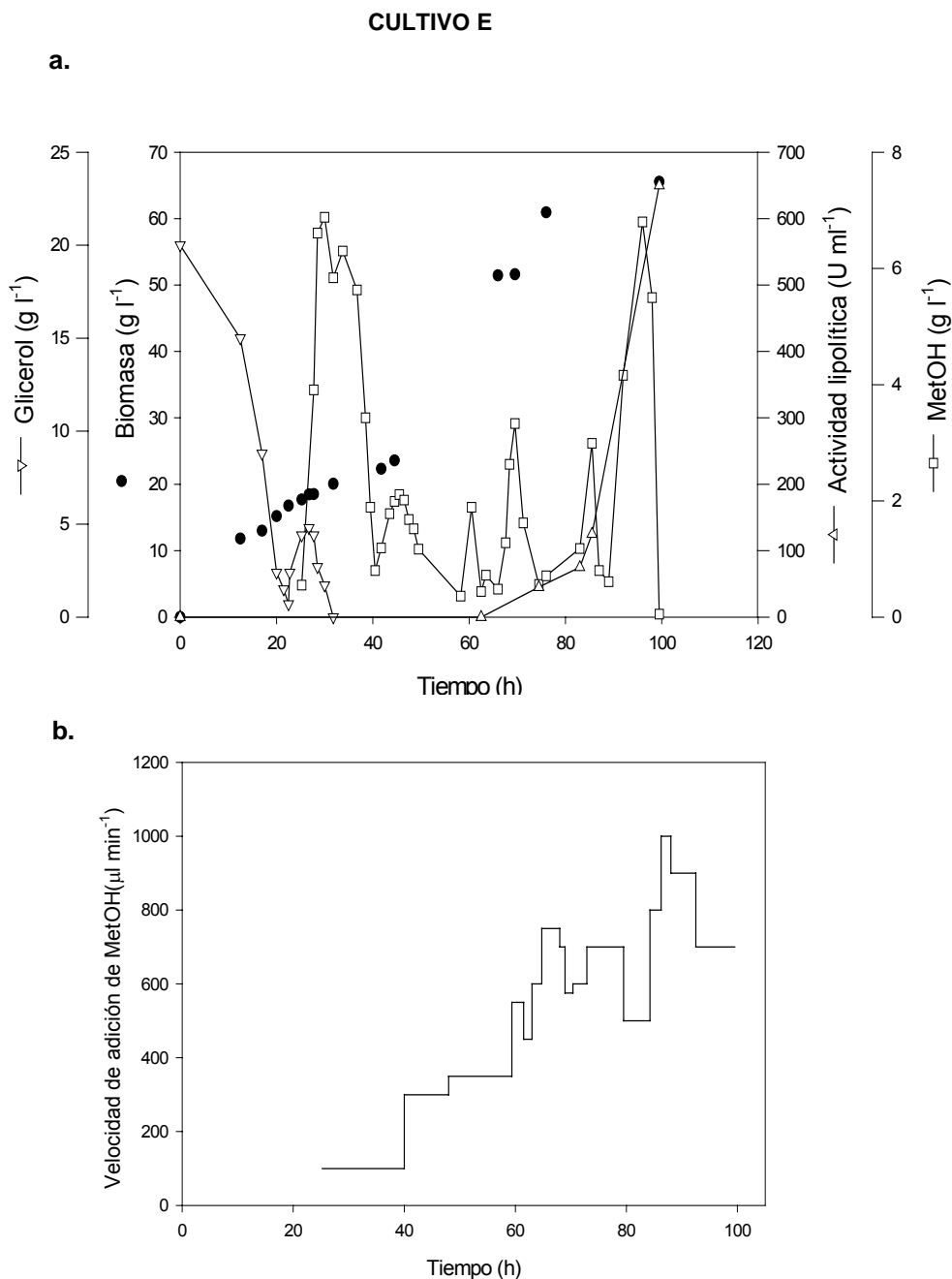


Figura 3. **a)** Cultivo en *fed-batch* de la cepa Mut<sup>+</sup> multicopia GSR500\_3 (*HIS4*). Representación de los principales parámetros del cultivo. **b)** Perfil de la velocidad de adición de metanol durante la etapa de *fed-batch* del cultivo.

La productividad final obtenida es de  $6785 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , a las 100 h de cultivo, aproximadamente un 65 % de la productividad obtenida en el CULTIVO C del capítulo anterior, al mismo tiempo de cultivo. Asimismo, la productividad específica por gramo de biomasa, generada en el CULTIVO E, a las 100 h de cultivo, es tan sólo un 43% de la alcanzada en el CULTIVO C, al mismo tiempo operacional, debido a que la biomasa alcanzada es de  $65 \text{ g l}^{-1}$ , mientras que en el CULTIVO C es de aproximadamente  $45 \text{ g l}^{-1}$ .



Esta diferencia respecto a los niveles de biomasa alcanzados podría estar relacionada con la diferente evolución de la velocidad de consumo de metanol en cada uno de los cultivos. La velocidad máxima de consumo de metanol en este cultivo (CULTIVO E) es similar a la máxima velocidad descrita en el CULTIVO C (CG+T). No obstante, en el CULTIVO E este máximo se alcanza tan sólo a las 30 horas de crecimiento en *fed-batch*, frente a las 80 h necesarias en el CULTIVO C (ver figura 4).

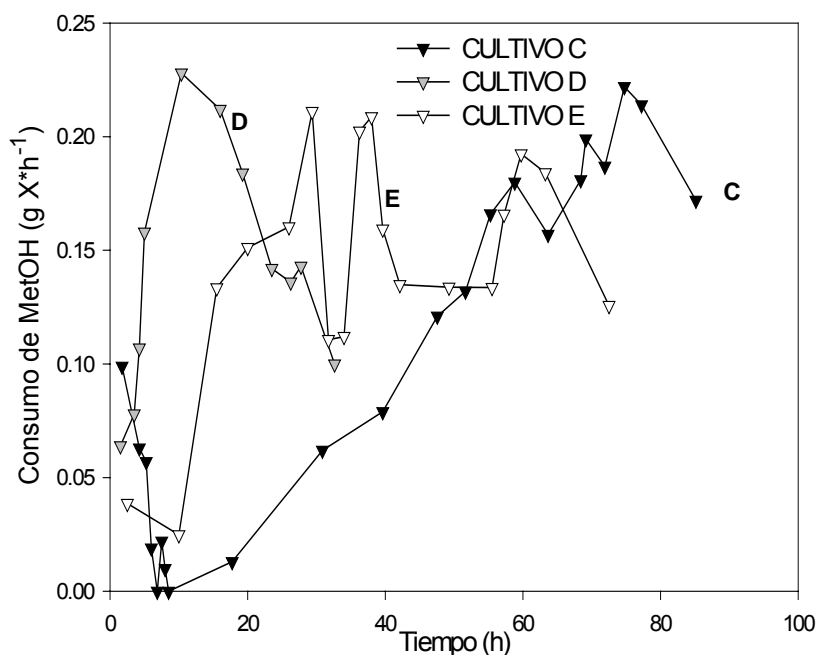


Figura 4. Evolución de la velocidad específica de consumo de metanol (gramo de metanol por gramo de biomasa y hora) en los cultivos C, D y E, durante el *fed-batch*. **C**: cultivo de la cepa de una única copia del gen *ROL*, **D**: cultivo de la cepa control que no contiene ninguna copia del gen *ROL*, **E**: cepa *ROL* multicopia.

Asimismo, la evolución del perfil de adición del metanol a lo largo de la etapa del *fed-batch* de cada uno de los cultivos (C y E) es también muy diferente. La modificación de la velocidad de adición de metanol se ha realizado de forma manual, en función de la lectura de la concentración de metanol en el caldo de cultivo, intentando mantener esta concentración entre los 2-5 g l<sup>-1</sup>. Por lo tanto, si la velocidad de adición del metanol es mayor en el CULTIVO E es, sin duda, porque ha habido una mayor capacidad por parte de las células de asimilar este substrato, como se ilustra en la figura 4.

Esta mayor capacidad de asimilación del metanol, en el CULTIVO E, puede haberse debido a distintos factores. Sin embargo, el más significativo es, sin duda, el hecho de que la cepa GSR500\_3 (*ROL* multicopia) es auxotrófica para el gen *HIS4*, y por lo tanto, se ha tenido que adicionar histidina a lo largo del CULTIVO E.

Debido a la imposibilidad de determinar los requerimientos necesarios de histidina en una población de células de crecimiento no homogéneo (típico de un cultivo en *fed-batch*), se aseguró que hubiera cantidades suficientes de este aminoácido durante toda la etapa del cultivo, adicionando 4 ml de una solución de histidina de  $0.10 \text{ g l}^{-1}$ , cada 24 h. No existen referencias bibliográficas respecto a un posible efecto represor de este aminoácido sobre la expresión del  $P_{AOX1}$ . Sin embargo, la presencia de un exceso de histidina en el medio de cultivo puede haber permitido la utilización de la histidina como fuente energética durante la etapa de transición, y a lo largo de la de inducción con metanol. Este hecho puede haber contribuido al aumento de la velocidad de consumo de metanol observado en el CULTIVO E, y también, al aumento de la biomasa final alcanzada en el cultivo.

La biomasa alcanzada al final del cultivo de la cepa *ROL* multicopia es de  $65 \text{ g l}^{-1}$ , mientras que la alcanzada en los cultivos de una única copia no llega a los  $50 \text{ g l}^{-1}$ . Este hecho implica una mayor lisis celular al final del cultivo, como se observa en la figura 6, y posiblemente una reducción de la actividad lipolítica detectada en el caldo de cultivo por la posible actividad proteasa liberada (ver figura 6).

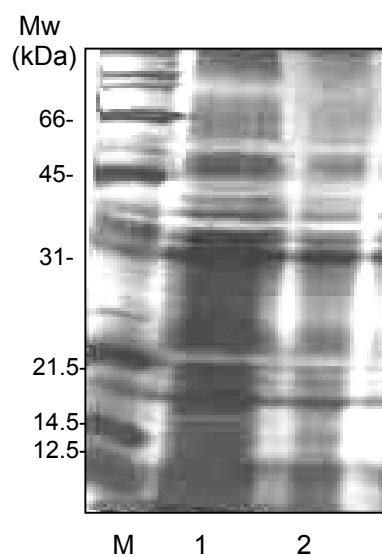


Figura 6. SDS-PAGE del extracto crudo de *ROL* recuperado del CULTIVO E. **M**: marcadores de peso molecular de proteínas (kDa), **1** y **2**: Muestras de extracto crudo de *ROL* recuperado del CULTIVO E.. Tinción de plata.

Asimismo, el hecho de alcanzar una mayor biomasa en el CULTIVO E puede haber contribuido a agotar alguno de los nutrientes del medio de cultivo, de forma que exista algún tipo de limitación por nutriente en las últimas etapas del *fed-batch*. En concreto, si se comparan las velocidades de adición de metanol durante el *fed-batch* de los cultivos A, B y C (de una única copia del gen *ROL*) respecto a la del CULTIVO E (cepa *ROL* multicopia), se observa que realmente existe una disminución del caudal de adición de metanol alrededor de las 70 h de

cultivo (en el CULTIVO E), precisamente cuando se alcanzan los  $50 \text{ g l}^{-1}$  de biomasa máximos a los que se llega en los cultivos anteriores

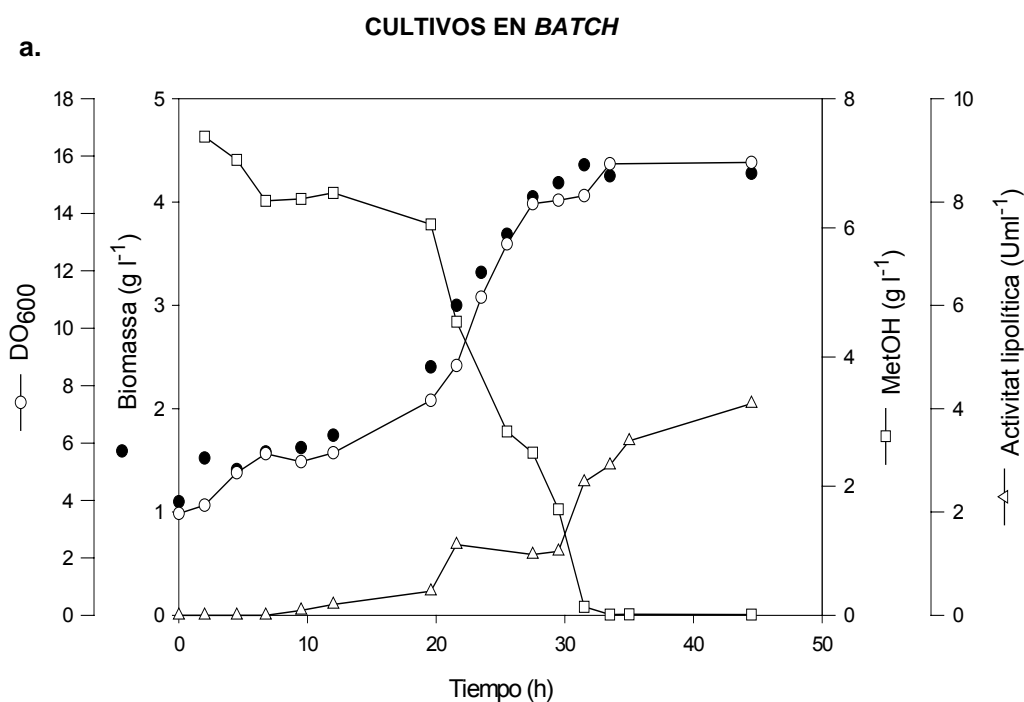
La comparación del nivel de producción, en bioreactor, de las cepas X-33/ROL y GSR500\_3 debería realizarse en condiciones de crecimiento idénticas para cada cultivo, evitando así que las posibles modificaciones respecto a la composición del medio pudieran influenciar sobre la adaptabilidad de las cepas al sistema, y por lo tanto, a los resultados de producción obtenidos.

El proceso de cultivo en *batch* no es el más satisfactorio respecto a los niveles de expresión de proteína heteróloga, debido a que la biomasa generada es mucho menor, principalmente. Sin embargo, posibilita una única adición de histidina al medio de cultivo, lo que permite idénticas condiciones de crecimiento para ambas cepas.

La utilización del test colorimétrico de *Roche Diagnostics* para la determinación de la actividad lipolítica (en lugar de la valoración mediante el pH-STATO) permite la detección y medida de niveles de actividad lipolítica inferiores, característicos del proceso en *batch*.

Se escogió una concentración de  $10 \text{ g l}^{-1}$  de metanol, superior a la considerada como óptima durante el *fed-batch*, debido a que, al tratarse de una operación en *batch*, esta concentración máxima de metanol es tan sólo transitoria y la población celular no está sometida a un cambio brusco respecto a la fuente de carbono (como sí ocurre en el *fed-batch*).

La figura 7 resume los resultados de producción obtenidos en el cultivo de las cepas X-33/ROL y GSR500\_3 en *batch*.



b.

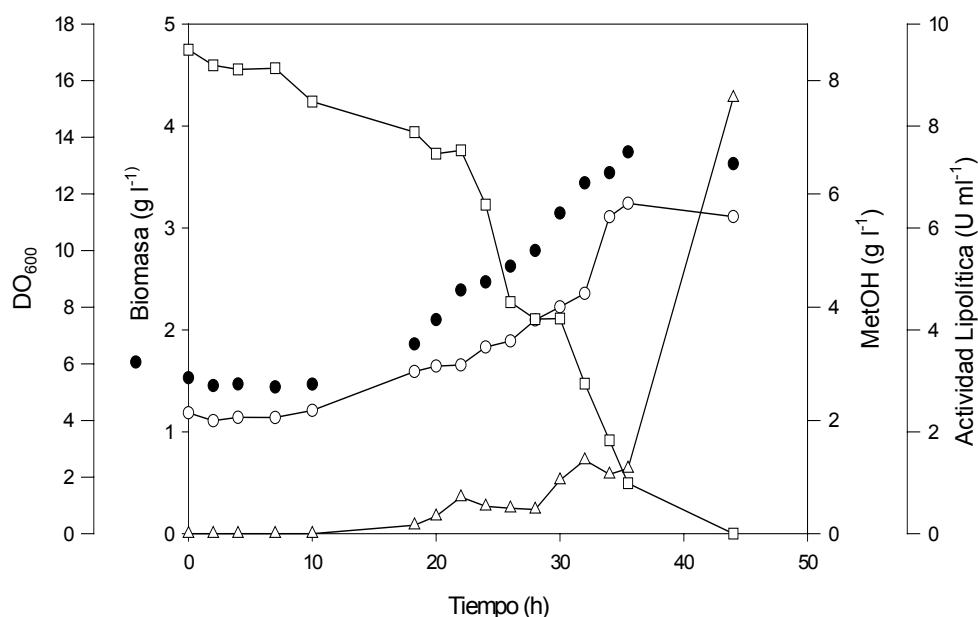


Figura 7. a). Cultivo en *batch* de la cepa X-33/ROL en medio mínimo. b): Cultivo en *batch* de la cepa ROL multicopia GSR500\_3 (*HIS4*), en medio mínimo y 0.04% (w/v) de histidina.

Los resultados obtenidos (figura 7) muestran que la expresión de la ROL es mayor en la cepa multicopia GSR500\_3 respecto a la de copia única X-33/ROL. A pesar de que el aumento de la actividad lipolítica tan sólo se observa puntualmente al final del cultivo, estos resultados estuvieron verificados repetitivamente.

En concreto, estos resultados indican una expresión lipolítica final (U ml<sup>-1</sup>) de la cepa GSR500\_3 2.08 veces mayor y 2.45 veces mayor la actividad específica (U g<sup>-1</sup>), respecto a la de la cepa de una única copia del gen *ROL*. Por lo tanto, estos resultados parecen demostrar que la cepa multicopia realmente muestra una mayor capacidad de expresión de la actividad lipolítica, como se observaba a menor escala en erlenmeyer.

Asimismo, estos cultivos en *batch* permitieron calcular las velocidades de crecimiento de cada una de las cepas en metanol (0.039 h<sup>-1</sup> y 0.066 h<sup>-1</sup>, para la cepa multicopia GSR500\_3 y la X-33/ROL, respectivamente). Estas diferencias apuntan a un posible efecto de la sobre expresión de la ROL sobre la cepa hospedadora, en concordancia a lo observado en el capítulo anterior de este trabajo.

Sin embargo, resulta necesario revertir la auxotrofia respecto al gen *HIS4*, de la cepa GSR500\_3, para poder operar con ambas cepas en condiciones similares de *fed-batch*.

### 2.3.3 REVERSIÓN DE LA AUXOTROFIA HIS<sup>-</sup> DE LA CEPA GSR500\_3.

La reversión se realizó utilizando el vector pPIC9K (*Invitrogen*), que contiene el gen *HIS4*. La recombinación entre las zonas homólogas del gen *HIS4* del DNA genómico de la cepa con las del vector se traduce en la inserción del gen *HIS4* en el cromosoma celular de la levadura, sin afectar para ello otras zonas no homólogas. Se obtuvieron células competentes de la cepa GSR500\_3 y se transformaron con el vector pPIC9K linearizado en *SaI*I por electroporación.

Posteriormente, se seleccionaron aquellos clones capaces de crecer en placas de medio mínimo MM en ausencia de histidina, como clones his<sup>+</sup> (ver materiales y métodos 2.2.6.2. de este capítulo). Previamente a su cultivo en bioreactores, se comprobó el fenotipo celular Mut<sup>+</sup> de los clones, seleccionándose aquellos Mut<sup>+</sup>, y la producción de ROL recombinante en erlenmeyer, utilizando un medio mínimo con 0.5 % (v/v) de metanol, y adicionando 0.10% de metanol cada 12 h. Se seleccionaron los clones X-33/500\_2 y X-33/500\_3 como cepas ROL multicopia (his<sup>+</sup>, Mut<sup>+</sup>) (ver figura 8).

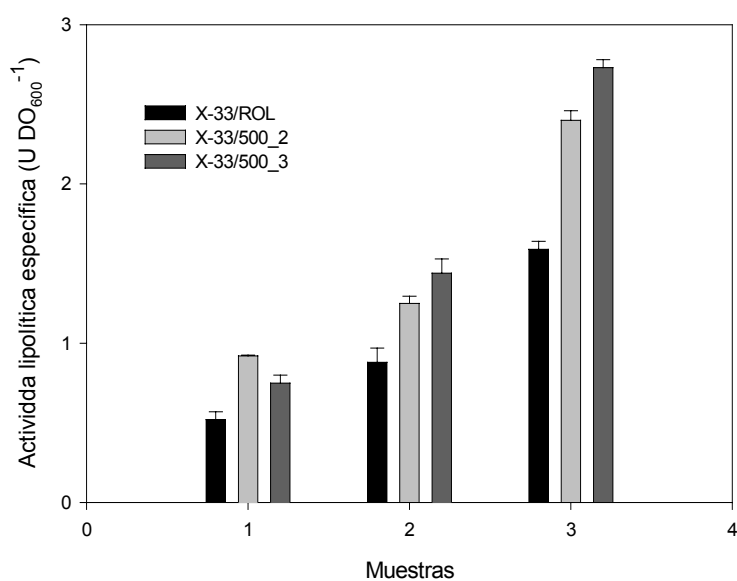


Figura 8. Resultados de producción de actividad lipolítica específica en erlenmeyer de las cepas seleccionadas como ROL multicopia his<sup>+</sup>, respecto a las de una única copia. 1, 2 y 3: Muestras extraídas a las 48 h, 70 y 100 h de cultivo, respectivamente.

Se escogió la cepa X-33/500\_3 como cepa ROL multicopia his<sup>+</sup> para su posterior cultivo en bioreactor, debido a que es la que expresaba una mayor actividad lipolítica con respecto a la cepa control.

### 2.3.4 CULTIVOS DE LA CEPA X-33/500\_3 EN FED –BATCH

Se realizaron una serie de cultivos en *fed-batch* con la cepa his<sup>+</sup>, ROL multicopia, X-33/500\_3, (O. Cos, UAB). Los niveles de actividad lipolítica alcanzados, en términos de producción final, fueron menores que los alcanzados en los cultivos previos, utilizando la cepa de una única copia del gen *ROL*, cepa X-33/ROL (CULTIVO C, CG+T).

El cultivo en *fed-batch* de la cepa X-33/500\_3 se realizó a lo largo de tan sólo 91 h, alcanzándose una biomasa final de 59.56 g l<sup>-1</sup> (O. Cos, UAB). Hay que destacar, que la actividad lipolítica en el caldo de cultivo a las 70 h es similar a la alcanzada, a un mismo tiempo operacional, en el cultivo en *fed-batch* de la cepa de una única copia del gen *ROL* (CULTIVO C), y desciende a partir de este momento (O. Cos, comunicación personal). En este punto, a las 70 h de cultivo, la biomasa alcanzada es de 50.44 g l<sup>-1</sup> (O. Cos, comunicación personal).

Este descenso en los valores de la actividad lipolítica extracelular detectada se corresponde con una disminución de la velocidad de adición del metanol, a partir de las 70 h de cultivo (O. Cos, UAB), lo cual también se observa en el CULTIVO E. Estos datos sugieren el hecho de que el proceso operacional en *fed-batch* pueda quedar limitado por algún nutriente en sus últimas etapas, tras haber alcanzado los 50 g l<sup>-1</sup> de biomasa. Además, la expresión y síntesis de una mayor carga proteica implica unos mayores requerimientos energéticos, de fuente de carbono y nitrógeno.

O. Cos (UAB) trabajó sobre esta hipótesis hallando que existe una limitación real por fuente de nitrógeno en las últimas etapas del cultivo una vez superados los 50 g l<sup>-1</sup> de biomasa, en el *fed-batch* de la cepa multicopia X-33/500\_3, por lo que este mismo hecho posiblemente ocurre en el CULTIVO E (cepa GSR500\_3). Asimismo, se observó una mayor velocidad de crecimiento en metanol de la cepa multicopia X-33/500\_3 durante las primeras etapas del cultivo en *fed-batch*, que puede haberse debido a que los niveles de metanol se consiguieron mantener perfectamente entre 1 y 3 g l<sup>-1</sup> a lo largo de este cultivo. Estas condiciones son óptimas para evitar la toxicidad del metanol (y sus subproductos) y potenciar el crecimiento, lo cual no parece favorecer la expresión de la *ROL*, y además, pueden contribuir a agotar los recursos energéticos del cultivo.

Por lo tanto, parece difícil extrapolar las condiciones óptimas para una mayor expresión de la *ROL* para el cultivo de diferentes cepas, de una o múltiples copias del gen *ROL*, sobre todo sin contar con un proceso de cultivo en *fed-batch* robusto, es decir, que equiparara estrictamente las condiciones de cultivo.

### 2.3.5 EFECTO DEL FENOTIPO CELULAR Mut EN LA PRODUCCIÓN DE ROL RECOMBINANTE EN *P. pastoris*.

Como se ha mencionado en la introducción de éste capítulo, el fenotipo celular Mut es otro de los factores influyentes sobre la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Con el propósito de estudiar este efecto sobre la producción de ROL recombinante, se construyó una cepa de *P. pastoris* (que albergara el gen de la ROL) de fenotipo Mut<sup>s</sup>.

La construcción de esta cepa se llevó a cabo mediante transformación por electroporación de células competentes de la cepa comercial KM71(his<sup>-</sup>, Mut<sup>s</sup>) con el vector pPICZA $\alpha$ -ROL (linearizado en SacI). Se aislaron los clones Mut<sup>s</sup> en placas de YPD con 100  $\mu$  ml<sup>-1</sup> de Zeocina. Posteriormente, se comprobó la inserción de una única copia del gen ROL en el genoma celular de la cepa mediante análisis de hibridación del DNA (*southern blot*) y se realizaron experimentos de cultivo en erlenmeyer, con medio mínimo y 0.5% (v/v) de metanol, analizándose la actividad lipolítica detectada. Se seleccionó el clon KM100\_0/ROL (Mut<sup>s</sup>, his<sup>-</sup>), como cepa de fenotipo lento respecto a la utilización del metanol y una única copia del gen ROL. Posteriormente, se prosiguió a la reversión de la auxotrofia de la cepa para el gen *HIS4*, para evitar tener que adicionar histidina a lo largo del cultivo del mismo. La reversión de la cepa KM100\_0/ROL se realizó por electroporación con el vector pPIC9K (*Invitrogen*). Se seleccionaron los clones his<sup>+</sup> en placas de medio mínimo sin histidina y nuevamente se comprobó la expresión de ROL en cultivos en erlenmeyer (ver figura 9).

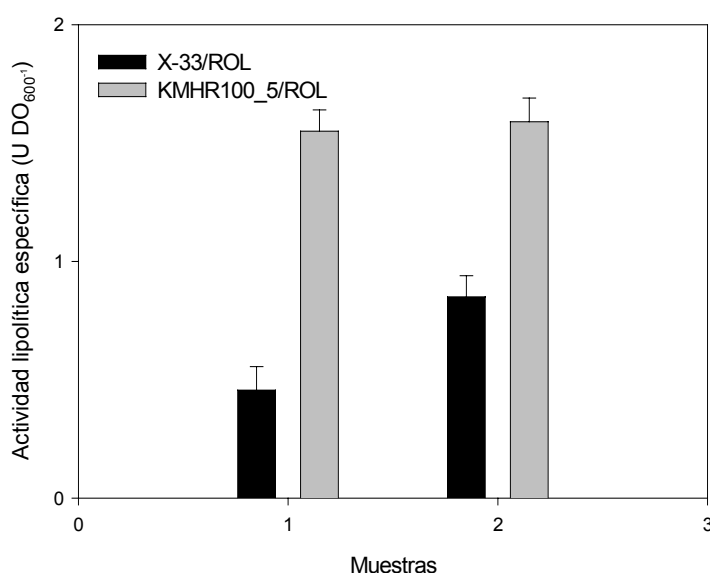


Figura 9. Actividad lipolítica específica obtenida del cultivo en erlenmeyer de la cepa KMHR100\_5/ROL (his<sup>+</sup>, Mut<sup>s</sup>) y la cepa control X-33/ROL (Mut<sup>+</sup>). 1: 24 h de cultivo. 2: 48 h de cultivo. (Ver materiales y métodos 2.2.6.3).

Como puede observarse en la figura 9, se obtuvo un clon (KMHR100\_5/ROL) con una nivel de actividad lipolítica específica alcanzada mayor que la que se obtiene en el cultivo con la cepa X-33/ROL (Mut<sup>+</sup>), a pesar de que la actividad lipolítica total no lo fue.

En general, se ha observado, en cultivos de producción con levaduras metilotróficas, que velocidades de crecimiento celular en metanol lentas (inferiores a las máximas descritas para estos sistemas) favorecen la actividad de las enzimas responsables de la utilización de la energía, obtenida por la combinación de sustratos mixtos, hacia la síntesis de proteínas foráneas (Müller *et al.*, 1986, Egli *et al.*, 1980, 1982, 1986). En particular, existen resultados concretos de cultivos de producción de proteínas recombinantes expresadas en *P. pastoris* y *H. polymorpha* en los que se observa que, en condiciones limitantes de metanol, la inducción de las proteínas heterólogas bajo el control del P<sub>AOX1</sub> aumenta a velocidades de crecimiento celular bajas (Van Dijcken *et al.*, 1976, Eggeling *et al.*, 1980, Boze *et al.*, 2001). Resultados similares, han sido recientemente referenciados en otros trabajos de producción de proteínas heterólogas bajo el control del P<sub>AOX1</sub> en *P. pastoris*. En concreto, en el trabajo de Kobayashi *et al.*, (2000), para la producción de albúmina de suero humano en *P. pastoris*, se determina una velocidad de crecimiento celular óptima que aporta la máxima producción del sistema. Esta velocidad de crecimiento celular está por debajo de la velocidad de crecimiento máxima de la cepa en metanol y se consigue a través de una programa dinámico que controla la velocidad de adición del metanol durante el *fed-batch*, para que se alcance la velocidad de crecimiento óptima (Kobayashi *et al.*, 2000).

El análisis de los resultados hasta aquí obtenidos, junto con los observados en el cultivo en erlenmeyer de las cepas Mut<sup>s</sup> (figura 9) indican que la producción de la lipasa parece estar favorecida por velocidades de crecimiento lentas, típicas de las cepas Mut<sup>s</sup>. Bajo estas observaciones se desarrollaron cepas ROL multicopia Mut<sup>s</sup>, según la misma metodología descrita a lo largo de este capítulo, cuyo estudio de producción y expresión está en curso en la actualidad por O. Cos (UAB).

### **2.4 CONCLUSIONES**

1. Se ha obtenido una cepa de *P. pastoris* de fenotipo Mut<sup>+</sup>, his<sup>+</sup>, que contiene varios genes de la ROL (X-33/500\_3), como se ha comprobado mediante análisis de hibridación del DNA (*southern blot*). La cepa X-33/500\_3 expresa mayores niveles de actividad lipolítica en cultivos a baja densidad celular. Sin embargo, en cultivos a elevada densidad celular, la producción final obtenida con la cepa X-33/500\_3 es menor que la de la cepa X-33/ROL, aunque se obtienen niveles de productividad transitorios similares. Estos niveles de productividad no se mantienen, ni se aumentan, a lo largo del cultivo en *fed-batch* debido



posiblemente a limitaciones por fuente de nitrógeno y al hecho de unas condiciones variables del cultivo en *fed-batch*.

2. Los resultados de la actividad lipolítica alcanzada en cultivos a baja densidad y a elevada densidad, revelan la importancia que tienen las condiciones ambientales en la expresión de la ROL. Además, la generación de cepas ROL multicopia representa una vía alternativa para el estudio de los posibles efectos de la expresión de la ROL sobre la velocidad de crecimiento de la cepa de hospedadora, como se ha observado en los cultivos en *batch*.
3. Se ha obtenido una cepa de *P. pastoris*, isogénica a la X-33/ROL, pero de fenotipo Mut<sup>s</sup>: KM100\_5/ROL. Además, se ha comprobado que el fenotipo celular Mut influye sobre la capacidad de producción de la ROL en *P. pastoris*, obteniéndose mayores niveles de actividad lipolítica específica mediante el cultivo de la cepa KMR100\_5/ROL que los obtenidos en el cultivo de la cepa X-33/ROL. Por lo tanto, parece ser que la expresión de la ROL en *P. pastoris* está favorecida por velocidades de crecimiento en metanol lentas.
4. Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la velocidad específica de crecimiento en metanol de *P. pastoris* es uno de los parámetros más importantes para la optimización de la expresión heteróloga de la ROL. Optimizar el proceso de cultivo, manteniendo una concentración de metanol constante (entre 1 y 3 g l<sup>-1</sup>) aumenta la velocidad de crecimiento de la cepa, agotándose algunos de los recursos nutritivos del sistema y perjudicando a la larga la producción final. Probablemente, la expresión de la ROL en cepas Mut<sup>s</sup> multicopia en cultivos a elevada densidad celular podría ser más satisfactoria (respecto a cepas Mut<sup>+</sup>) en cuanto a la actividad lipolítica específica alcanzada, aunque alargaría considerablemente el proceso operacional. Se han desarrollado cepas ROL multicopia Mut<sup>s</sup> para corroborar estas hipótesis.
5. Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que existe una velocidad de crecimiento óptima para la expresión de la ROL en *P. pastoris*, y éste podría ser el parámetro clave a controlar durante la etapa de *fed-batch* optimizando así la producción final del sistema.



### CAPÍTULO 3. Promotores de expresión alternativos al $P_{AOX1}$ para la producción de una lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) en *P. pastoris*: expresión constitutiva ( $P_{GAP}$ ) e inducción por la fuente de nitrógeno ( $P_{FLD1}$ ).

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

El promotor  $P_{AOX1}$  es el más ampliamente utilizado para la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* debido, principalmente, a sus elevados niveles de inicio de transcripción y su fuerte regulación. Sin embargo, existen otros promotores de expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris* (Lin Cereghino and Cregg, 2000). La razón principal de la utilización de otros promotores, diferentes al  $P_{AOX1}$ , es evitar la utilización del metanol como fuente de carbono y substrato inductor de la producción.

El metanol es inflamable, por lo que su utilización puede ser potencialmente peligrosa en procesos a gran escala en cultivos de elevada densidad celular en los que se necesitan volúmenes grandes de este substrato. Además, el uso del metanol es indeseable en aquellos procesos de producción de proteínas relacionadas con la industria alimentaria, debido a su elevada toxicidad. Por último, controlar los niveles de metanol en el caldo de cultivo es imprescindible para la optimización de la producción bajo el control del  $P_{AOX1}$ , en particular, es importante mantenerlos bajo una concentración que no resulte tóxica para el crecimiento celular, lo que complica el diseño de la operación de cultivo.

Entre los promotores de expresión alternativos al  $P_{AOX1}$  en *P. pastoris* (Lin Cereghino and Cregg, 2000). existen dos cuyos niveles de expresión se han descrito en algunos casos similares a los alcanzados con el  $P_{AOX1}$ . Estos son: el promotor del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa ( $P_{GAP}$ ), comercializado por la compañía *Invitrogen*, y el del gen formaldehído deshidrogenasa 1 ( $P_{FLD1}$ ), no comercial

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es una enzima de expresión constitutiva en la célula durante el crecimiento bajo fuentes de carbono como la glucosa o el glicerol. Los niveles de expresión de esta enzima en presencia de glucosa son comparables a los obtenidos para la enzima alcohol oxidasa en presencia de metanol (Waterham *et al.*, 1997). Por otro lado, en condiciones de crecimiento bajo otras fuentes de carbono, como el glicerol, los niveles de expresión del  $P_{GAP}$  son aproximadamente dos tercios de los obtenidos en glucosa (Waterham *et al.*, 1997).

A pesar de estas diferencias de expresión según la fuente de carbono, el  $P_{GAP}$  se ha utilizado exitosamente para la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* obteniéndose niveles

de producción satisfactorios (Boer *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2001), y en algunos casos, incluso una producción mayor que bajo el  $P_{AOX1}$  (Döring *et al.*, 1997). Sin embargo, el  $P_{GAP}$  no está recomendado para la expresión de aquellas proteínas que puedan resultar tóxicas para la célula hospedadora debido, precisamente, a su expresión constitutiva (Lin Cereghino *and* Cregg, 2000).

Siguiendo otra estrategia, Shigang *et al.*, (1998), aislaron y caracterizaron el gen de la formaldehído deshidrogenasa 1,  $FLD1$ , de *P. pastoris* y estudiaron la producción de  $\beta$ -lactamasa bajo el promotor de dicho gen, el  $P_{FLD1}$ . En *P. pastoris*, la formaldehído deshidrogenasa está involucrada en el metabolismo del metanol y en el de la asimilación de aminos metiladas como fuente de nitrógeno. La asimilación de aminos metiladas, como fuente de nitrógeno, es una característica común entre aquellos géneros de levaduras que contienen la enzima amino oxidasa, responsable de la oxidación de las aminos alquiladas a formaldehído, peróxido de hidrógeno y amonio, como productos finales. La posterior oxidación del formaldehído depende de la enzima formaldehído deshidrogenasa dependiente a su vez de glutatona (ver sección C, Introducción General, páginas 9 y 11).

Existen pocos estudios sobre la regulación del  $P_{FLD1}$  en *P. pastoris*, al margen del realizado por Shigang *et al.*, (1998). En el trabajo citado, se estudia la expresión de la  $\beta$ -lactamasa bajo el control de dicho promotor en *P. pastoris*. Los resultados obtenidos indican que el  $P_{FLD1}$  se induce tanto en presencia de metanol como fuente de carbono y sulfato de amonio o metilamina, como fuente de nitrógeno, o bajo la combinación de sustratos glucosa y metilamina. No obstante, todavía no se han estudiado diseños o esquemas de producción basados en este promotor.

Así pues, en este trabajo se exploró la utilización del  $P_{GAP}$  y del  $P_{FLD1}$  en la expresión heteróloga de una lipasa de *R. oryzae* (ROL) en *P. pastoris*, como alternativa al sistema de expresión basado en el  $P_{AOX1}$ . Además, la expresión constitutiva de la ROL, bajo el  $P_{GAP}$ , permitiría corroborar ciertas evidencias de un posible efecto negativo o tóxico de la expresión de esta lipasa de *R. oryzae* en *P. pastoris*.

### **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.2.1 Cepas y vectores**

Se utilizó la cepa salvaje de *P. pastoris* X-33. Para la manipulación del DNA se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  (*Life Technologies*). Los vectores de expresión utilizados fueron el pGAPZ $\alpha$ A-ROL y el pPICFLD $\alpha$ -ROL, los cuales fueron construidos para el presente trabajo tal y como se describe en el siguiente apartado.

### 3.2.2 Construcción de vectores

#### 3.2.2.1 PCR y SOE-PCR (*sequence overlap extension PCR*):

La construcción de la secuencia P<sub>FLD1</sub>αROL (la fusión del promotor del gen *FLD1* con la señal de secreción factor α de *S. cerevisiae* y el gen *ROL*) se realizó mediante amplificación por PCR, en primer lugar, de los fragmentos αROL y la región del P<sub>FLD1</sub> de forma independiente, y posteriormente, se unieron ambos por SOE-PCR. La región del P<sub>FLD1</sub> se amplificó a partir del vector pSS040 (Shigang *et al*, 1998) cedido por J. Cregg (*KGI*, CA, EEUU), para este trabajo. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región del P<sub>FLD1</sub> fueron el AS4: (5'-AGTCTACGAGATCTGCATGCAGGAATCTCTGGCACG-3'), que introduce un sitio *Bgl*I (subrayado) en posición 5' y AS2: (5'-TGAAGGAAATCTCATTGTGAATATCAAGAATTGTATGAAC-3'), cuya secuencia en 5' complementa la 5' del factor α de *S. cerevisiae* (en cursiva). Para la amplificación del αROL se utilizó el vector original pPICZαA-ROL como DNA molde y los oligonucleótidos AS1 y AS3: AS1: (5'-CAATTCTTGATATTCACAATGAGATTTCTTCAATTTTTACTG-3'), que complementa en 5' con la secuencia 3' del P<sub>FLD1</sub> (en cursiva), y AS3: (5'-GATCCACGTGCGGCCGCTTATTACAAACAAGC-3'), que introduce un sitio *Not*I

(subrayado) en posición 3' del fragmento αROL (ver figura 1, página 85). Las condiciones de PCR fueron 94°C (10 minutos) de desnaturalización, y 25 ciclos a 94°C (1 minuto), 55°C (1 minuto) y 72°C (1 minuto) como temperaturas y tiempos de desnaturalización, hibridación y elongación respectivamente, más 10 últimos minutos de elongación a 72°C. Se utilizaron dNTPs a una concentración de 10 mM, 20 pmols μl<sup>-1</sup> de oligonucleótidos, 100 ng de DNA molde, y 0.5 μl de enzima DNA polimerasa *High Expand* (*Roche Diagnostics*), en un volumen total de reacción de 50 μl. Los fragmentos amplificados se recuperaron directamente de los geles de agarosa, 1% (w/v) en tampón TAE 1X, y utilizando el *Qiagen gel extraction kit* (*Qiagen*), siguiendo las instrucciones del suministrador. Para la SOE-PCR, se realizaron 10 ciclos de PCR, bajo las mismas condiciones, utilizando las secuencias complementarias de los fragmentos αROL y P<sub>FLD1</sub> (generados en la PCR anterior, señaladas en cursiva) como sitios de inicio de la extensión. Posteriormente, se paró el ciclo y se introdujeron los oligonucleótidos AS3 y AS4 (20 pmols μl<sup>-1</sup> cada uno) y se prosiguió durante 15 ciclos más (ver figura 1, página 85).

El producto de SOE-PCR se purificó directamente de un gel de agarosa, 1% (w/v) en tampón TAE 1X, y utilizando el *Qiagen gel extraction kit* (*Qiagen*). Los geles de DNA se visualizaron mediante tinción con una solución de Bromuro de Etidio (10 g l<sup>-1</sup>), durante 10 minutos, y exposición a luz UV. La determinación de la concentración de los fragmentos de DNA se estimó aproximadamente mediante la visualización del DNA y comparación respecto a la concentración del marcador de peso molecular de DNA utilizado (1 Kb *ladder*, *Life Technologies*).

### *3.2.2.2 Digestión y ligación del DNA para la construcción de los vectores.*

El vector de expresión pGAPZ $\alpha$ A-ROL se construyó mediante clonaje del gen *ROL* en el vector comercial pGAPZ $\alpha$ A (*Invitrogen*), utilizando los sitios de restricción *EcoRI* y *NotI*. La digestión se llevó a cabo a 37°C, durante 4 h, en un volumen final de 50  $\mu$ l. Para la recuperación y visualización del DNA se realizaron geles de agarosa (al 1% (w/v) en tampón TAE 1X) y se utilizó Bromuro de Etidio (10 g l<sup>-1</sup>) bajo exposición a luz UV. Las bandas de DNA se recuperaron directamente del gel de agarosa y se purificaron mediante el *Qiagen Gel Extraction Kit* (Qiagen), según instrucciones especificadas por el suministrador.

La ligación de los fragmentos de DNA cohesivos se realizó a temperatura ambiente, durante 12-14 h utilizando una relación molar de vector: inserto de 1: 5. La ligasa utilizada fue la T4 (*Roche Diagnostics*).

El vector pPICFLD $\alpha$ -ROL se construyó utilizando como esqueleto el vector pPICZA $\alpha$ -ROL, en el que se substituyó la secuencia P<sub>AOX1</sub> $\alpha$ ROL por la P<sub>FLD1</sub> $\alpha$ ROL mediante digestión enzimática del vector e inserto (pPICZA $\alpha$ -ROL y P<sub>FLD1</sub> $\alpha$ ROL, respectivamente) con las enzimas de restricción *BglII* y *NotI* y la posterior ligación de los fragmentos desados, bajo las condiciones descritas anteriormente. La dirección del inserto se comprobó a través de la digestión con *NsiI* (que corta en la zona P<sub>FLD1</sub>) y *NotI* (que corta al final, 3', de la secuencia del gen *ROL*).

### **3.2.3 Transformación**

#### *3.2.3.1 Competentes y condiciones de transformación*

Las células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  son comerciales (*Life Technologies*) y se transformaron mediante choque térmico, según el protocolo suministrado por la compañía.

Las células de *P. pastoris* X-33 se transformaron por electroporación, siguiendo el mismo protocolo descrito en la página 31-32, para la generación de componentes así como las condiciones de electroporación. Para su transformación en *P. pastoris*, el vector pGAPZ $\alpha$ A-ROL se linearizó con la enzima *SalI*. La linearización del vector pPICFLD $\alpha$ -ROL se realizó con la enzima *NsiI* dirigiéndose la integración de éste, por recombinación homóloga, al P<sub>FLD1</sub> genómico, generando un fenotipo Mut<sup>+</sup>, Fld<sup>+</sup>.

La selección de los clones transformantes se realizó en placas de LB-*low salt* (10 g de triptona, 5 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura, pH 7.5, por litro de agua destilada) + 25  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de Zeocina, para las células de *E. coli*, y de RDB (sorbitol 1 M, 10 g dextrosa, 13.4 g de yeast nitrogen base (w/o aa & ammonium sulfate), 4x10<sup>-4</sup> g de biotina y 20 g de agar, por litro de agua destilada) + 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de Zeocina para las de *P. pastoris*.

### 3.2.3.2 Extracción y precipitación de DNA plasmídico

Las extracciones de DNA plasmídico se realizaron mediante el *Plasmid Extraction kit* (Qiagen), siguiendo las indicaciones del suministrador. El DNA se precipitó mediante acetato de sodio 3 M, pH 5.2, y 2.5 volúmenes de etanol 100%, a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizaron lavados del DNA con 70 y 100 % de etanol, a  $4^{\circ}\text{C}$  y centrifugando a 12000 xg, durante 30 minutos después de cada lavado. Finalmente el DNA precipitado se resuspendió en agua milliQ estéril.

### 3.2.4 Secuenciación del DNA

La secuenciación del vector de expresión pPICFLD $\alpha$ -ROL se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de la UAB. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del pPICFLD $\alpha$ /ROL fueron los denominados AS6: (5'-ATCGTTGTAGTATCTACCTGG-3'), AS7: (5'-GGCTAAGGACTTCCTCATCG-3'), AS8: (5'-CCAACTCCTTCAGAAGTGCC-3'), y AS9: (5'-ATAGTCATTGACAACCTTGCTC-3'), a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  cada uno, y 100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  de DNA molde.

### 3.2.5 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

#### 3.2.5.1. Cultivos en erlenmeyer

Se utilizó el medio LB-*low salt* para el cultivo líquido y sólido (en placa) de las cepas de *E. coli*, suplementado con 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de Zeocina, y con tan sólo 5 g  $\text{l}^{-1}$  de NaCl en su composición. Los cultivos líquidos de *P. pastoris* se realizaron en medio YPD (10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 20 g de dextrosa) suplementado con 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de Zeocina.

En los cultivos de inducción de la expresión de la ROL mediante fuente de nitrógeno se utilizaron cuatro tipos de medio:

GN (Glucosa +  $\text{NH}_4^+$ ): 0.4 % (w/v) de glucosa, 0.5 % (v/v)  $\text{NH}_4^+$ , 0.17% (w/v) YNB (w/o aa & amonium sulfate), 0.05% (w/v) de biotina.

GM (Glucosa + metilamina): 0.4 % (w/v) de glucosa, 0.25 % (v/v) de metilamina, 0.17% (w/v) YNB (w/o aa & amonium sulfate), 0.05% (w/v) de biotina.

MM (Metanol + Metilamina): 0.5% (v/v) de metanol, 0.25 % (v/v) de metilamina, 0.17% (w/v) YNB (w/o aa & amonium sulfate), 0.05% (w/v) de biotina.

MN (Metanol +  $\text{NH}_4^+$ ): 0.5% (v/v) de metanol, 0.5 % (v/v)  $\text{NH}_4^+$ , 0.17% (w/v) YNB (w/o aa & amonium sulfate), 0.05% (w/v) de biotina.

Las condiciones experimentales de los cultivos fueron: 50 ml de inóculo en medio YPD, centrifugación del inóculo a 5000 rpm y resuspensión de las células en 200 ml de volumen de cultivo GN, GM, MM o MN, respectivamente, a una  $\text{DO}_{600}$  inicial de 0.1-0.25,  $30^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm.

### *3.2.5.2 Cultivos a elevada densidad celular*

El cultivo de expresión constitutiva de la ROL se llevó a cabo en un bioreactor *Biostat ED* (Braun), con una cuba de 5 l de capacidad, y un volumen de cultivo inicial de 3.5 l, utilizándose un medio mínimo sintético (detallado en el apartado 1.2.4.3, página 33) y 20 g l<sup>-1</sup> de glucosa como fuente de carbono. El medio de adición del *fed-batch* corresponde a 1 l de 200 g l<sup>-1</sup> de glucosa suplementado con 4.35 ml de sales traza PMT1 (ver composición en página 33, en 1.2.4.3) por litro de medio de cultivo inicial. El caudal de adición fue de 500-900 µl min<sup>-1</sup>, en función de la evolución de la presión parcial de oxígeno (pO<sub>2</sub>).

Las condiciones experimentales del cultivo fueron: pre-inóculo de 50 ml e inóculo de 500 ml en YPD, centrifugación a 5000 rpm y resuspensión de las células en medio mínimo sintético, para su cultivo en bioreactor. Las condiciones de cultivo fueron 30°C, pH 5.0 (mantenido mediante NH<sub>4</sub>OH 2 M), una agitación entre 500-600 rpm y 0.5 l min<sup>-1</sup> de caudal de aire de entrada para mantener unas condiciones de crecimiento aeróbicas (pO<sub>2</sub> ≥ 20%) en el caldo de cultivo.

### **3.2.6 Métodos analíticos**

#### *3.2.6.1 Biomasa*

El seguimiento de la biomasa se realizó mediante la determinación del peso seco celular y a través del valor de la lectura de DO<sub>600</sub> (página 34, apartado 1.2.7.1).

#### *3.2.6.2. Análisis de la actividad lipolítica.*

Se utilizó el ensayo colorimétrico de determinación de actividad lipolítica de *Roche Diagnostics*, tal y como se describe en la página 61, apartado 2.2.7.2.

#### *3.2.6.3 Determinación de la concentración de glucosa.*

La concentración de D-glucosa se determinó mediante el analizador bioquímico YSI2700 SELECT (*Yellow Spring Instruments*).



### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1 EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE LA ROL (VECTOR pGAPZ $\alpha$ A-ROL).

Se obtuvieron diversos clones de *P. pastoris*, de expresión supuestamente constitutiva de la ROL, mediante la transformación de células competentes X-33 con el vector pGAPZ $\alpha$ A-ROL, y se realizaron cultivos en erlenmeyer para comprobar los niveles de expresión de lipasa alcanzados (ver materiales y métodos 3.2.5.1, página 81). Sin embargo, los niveles de actividad lipolítica extracelular detectada en el sobrenadante de los cultivos de los distintos clones seleccionados fueron muy similares, y muy próximos al límite de detección del ensayo (datos no mostrados). Este hecho parece indicar un posible efecto tóxico de la expresión constitutiva de la ROL sobre las cepas hospedadoras, lo cual ya había sido sugerido en capítulos anteriores. No obstante, se escogió, al azar, el clon X-33GAP2\_5/ROL para estudiar su comportamiento en bioreactor.

Se realizó un cultivo de 5 l en *fed-batch*, con glucosa como fuente de carbono en un medio sintético, con el propósito de realizar el cultivo en bioreactor bajo unas condiciones lo más similares posible a los descritas anteriormente. Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 1. Tal y como se puede observar, la figura 1 no muestra niveles de actividad lipolítica alcanzada, debido a que éstos fueron, nuevamente, cercanos al límite de detección del ensayo.

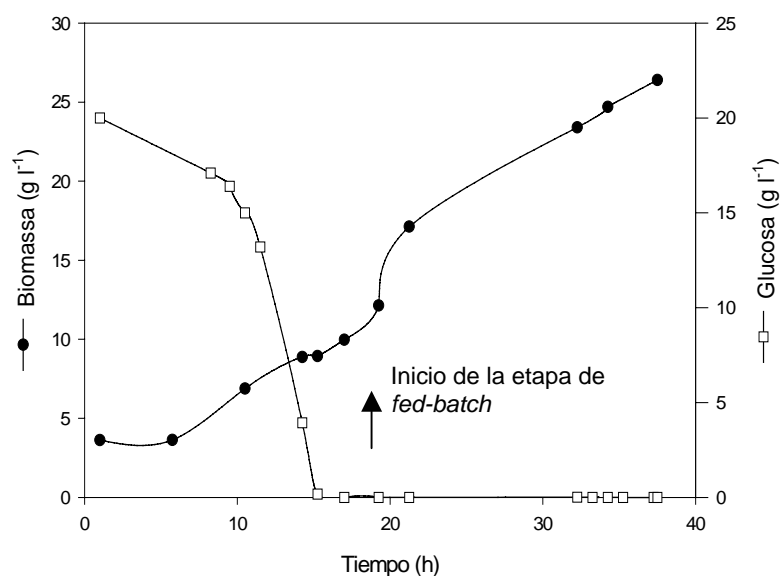


Figura 1. Cultivo en *fed-batch* de glucosa de la cepa de *P. pastoris* X-33GAP2\_5/ROL, expresión constitutiva. Flecha en negro: indica el inicio de la etapa de *fed-batch* con glucosa.

Los escasos niveles de actividad lipolítica detectados sugieren que la expresión constitutiva de la ROL en *P. pastoris* no resulta, aparentemente, un sistema de expresión satisfactorio. El cultivo en *fed-batch* se detuvo en cuanto los 200 g l<sup>-1</sup> de glucosa habían sido adicionados (ver materiales y métodos, apartado 3.2.5.2, página 82). Igualmente, hay que destacar el hecho de que los niveles de biomasa alcanzados están por debajo de los esperados con relación a la cantidad de glucosa adicionada (según un rendimiento biomasa-substrato para la glucosa del 50 % aproximadamente). Teóricamente, se esperaba conseguir una biomasa final de aproximadamente 35 g de peso seco, mientras que tan sólo se alcanzó un 65% de este valor.

Estas observaciones parecen estar en concordancia con los resultados obtenidos en el capítulo 1 de la sección E de Resultados y Discusión (página 29), donde se concluía en un posible efecto tóxico de la expresión de la ROL sobre la célula hospedadora. El trabajo de Beer *et al*, (1996), estudiando la expresión recombinante de la ROL madura en *E. coli* describe un efecto tóxico real bajo ese sistema.

Por lo tanto, parece ser que la expresión constitutiva de la ROL, desde las primeras etapas del crecimiento, tiene un efecto negativo sobre la producción, obteniéndose escasos niveles de proteína expresada. Por lo tanto, éste no es aparentemente un sistema viable y alternativo a la expresión de la ROL inducida por metanol, en *P. pastoris*.

### 3.3.2 EXPRESIÓN DE LA ROL INDUCIDA POR LA FUENTE DE NITRÓGENO

#### 3.3.2.1 Construcción del vector pPICFLD $\alpha$ -ROL

La construcción del vector pPICFLD $\alpha$ -ROL se realizó mediante SOE-PCR. Este vector contiene el gen *ROL*, en posición 3' respecto a la señal de secreción factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* (contenidos en el vector pPICZ $\alpha$ A-ROL) y en posición 5' el P<sub>FLD1</sub>, procedente del vector pSS040 (Shigang *et al*, 1998).

Esta técnica se basa en una primera amplificación mediante PCR de cada uno de los fragmentos por separado, utilizando oligonucleótidos que contienen secuencias complementarias a cada uno de los fragmentos respectivamente. Posteriormente a la amplificación por separado, los productos generados sirven como moldes para una segunda amplificación de la que se genera el fragmento global. Este fragmento total se amplifica durante varios ciclos más de PCR para obtener una cantidad suficiente de DNA para su manipulación. La figura 1 representa estas reacciones e ilustra el producto obtenido.

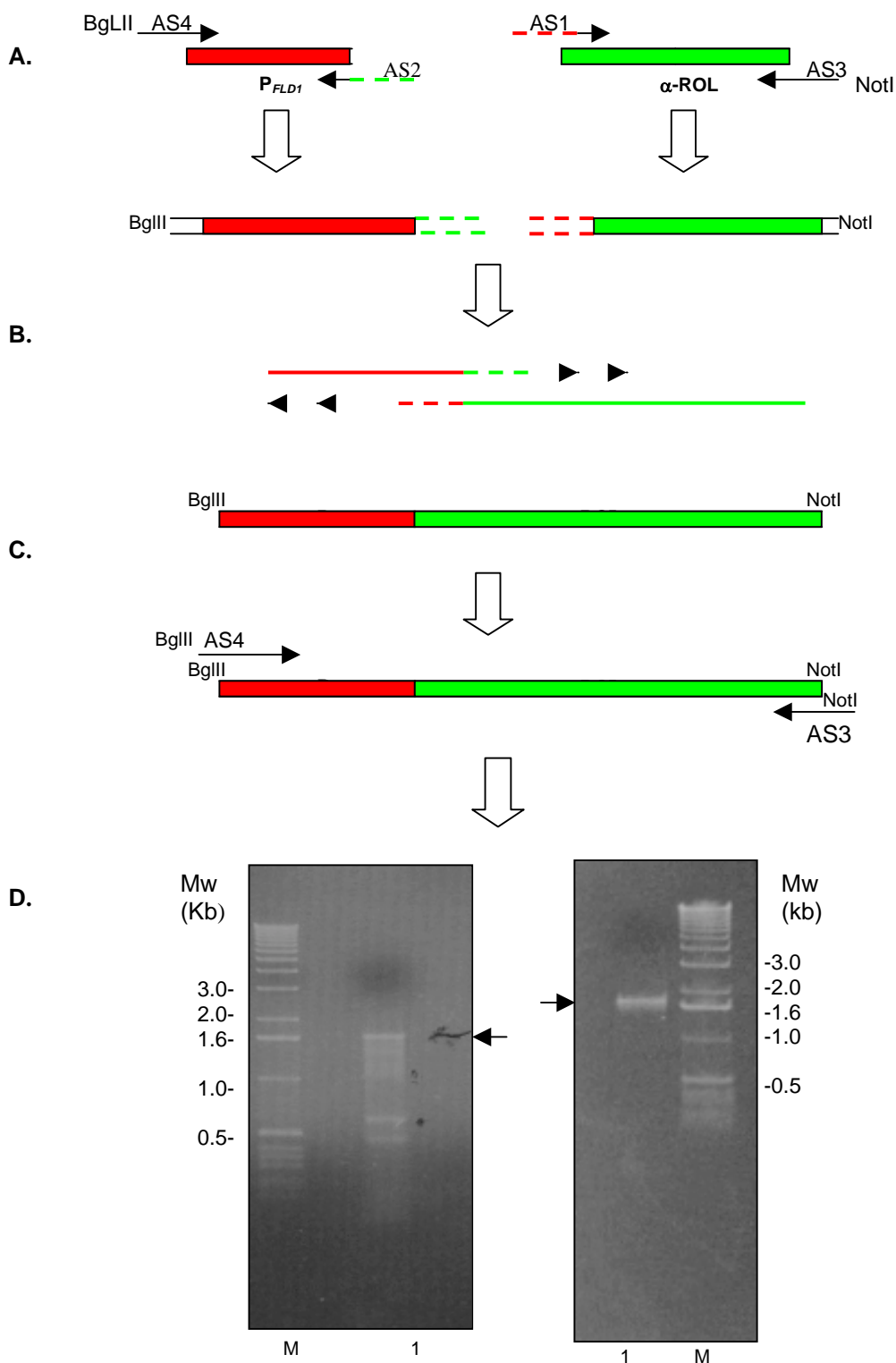


Figura 1. Representación de la SOE-PCR. **A:** 1<sup>o</sup> reacción de PCR en la que se amplifican las secuencias  $P_{FLD}$  y  $\alpha$ -ROL por separado, durante 25 ciclos. **B:** SOE-PCR: amplificación mediante las secuencias complementarias introducidas por los oligonucleótidos en la anterior reacción de PCR, durante 10 ciclos. **C:** Amplificación del producto total durante 15 ciclos más. **D:** gel de agarosa del (1): producto obtenido por SOE-PCR ( $P_{FLD1}\alpha$ ROL), de aprox. 1.6 kb, sin purificar (izda) y purificado (drcha), señalados por las flechas en negro. M: marcadores de peso molecular.

### E. RESULTADOS Y DISCUSIÓN\_CAPÍTULO 3

El vector pPICFLD $\alpha$ -ROL se construyó mediante la ligación del fragmento generado por SOE-PCR y el fragmento de 2.3 kb resultante de la digestión del vector pPICZA $\alpha$ -ROL con *Bgl*II y *Not*I (ver figura 2).

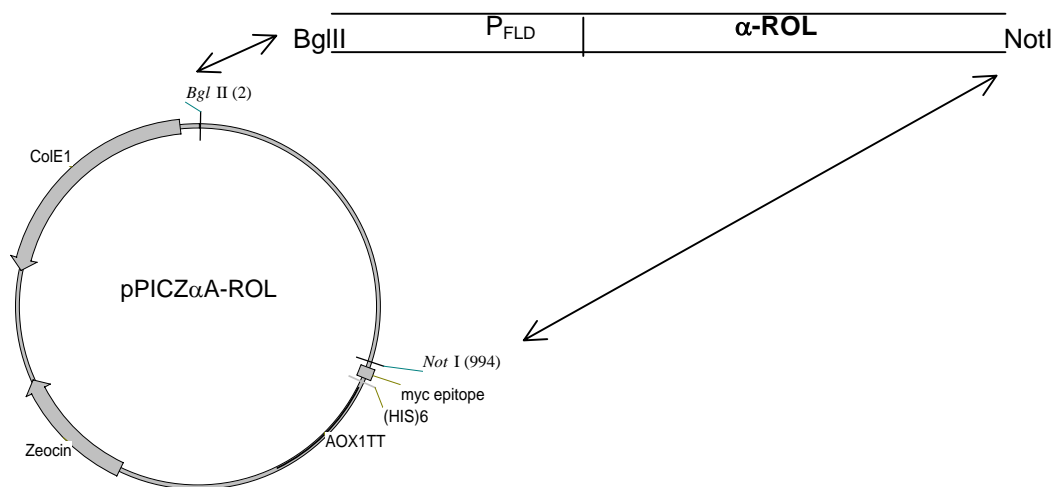


Figura 2. Construcción del vector pPICFLD $\alpha$ -ROL.

El plásmido pPICFLD- $\alpha$ ROL se transformó en *E.coli* DH5 $\alpha$ , obteniéndose una eficiencia de transformación muy baja (posiblemente debido a una reacción de ligación ineficiente), tan sólo tres clones transformantes, denominados DHFLD\_1, DHFLD-2, DHFLD\_3. Sin embargo el análisis de restricción con *Bgl*II/*Not*I de estos clones indica que tan sólo el DHFLD\_1 contiene la construcción correcta (figura 3).

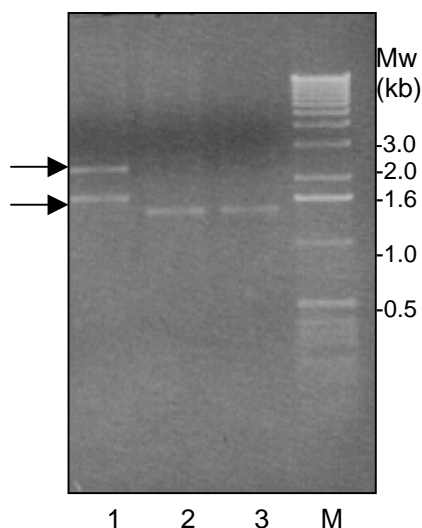


Figura 3. Fragmentos de DNA obtenidos de la doble digestión enzimática de los clones 1: DHFLD\_1. 2: DHFLD\_2. 3: DH3: FLD\_3. Las flechas en negro marcan los fragmentos de aprox.1.6 kb (P<sub>FLD</sub> $\alpha$ ROL) y 2.3 kb del vector pPICZ $\alpha$ A-ROL, tras la digestión. **M**: marcadores de peso molecular de DNA (kb).

### E. RESULTADOS Y DISCUSIÓN CAPÍTULO 3

El plásmido pPICFLD $\alpha$ -ROL, proveniente del clon de *E.coli* DHFLD\_1, se linearizó con *Nsi*I y se transformó en *P. pastoris* obteniéndose un tapiz de transformantes. De estos se escogieron 5 clones: X-33/FLDROL\_1, X-33/FLDROL\_5 X-33/FLDROL\_7, X-33/FLDROL\_8 y X-33/FLDROL\_9, resistentes a una concentración de Zeocina de 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  en placa.

Sin embargo, paralelamente, se obtuvieron los resultados de la secuenciación del vector pPICFLD- $\alpha$ ROL (proveniente del clon de *E.coli* DHFLD\_1). Durante el proceso de amplificación del gen ROL por SOE-PCR se introdujo una mutación en el gen de la ROL (el nucleótido T en posición 1910, según la secuencia del DNA de la ROL con número de acceso AF229435 en el *GeneBank*, fue substituido por un residuo C). Esta mutación implica, según el marco de lectura del gen *ROL*, el cambio del aminoácido F (fenilalanina) en posición 214 de la lipasa madura por una S (Serina) (ver figura 4).

```
MVSFISISQGVSLCLLVSSMMLGSSAVPVSGKSGSSTTAVSASDNSALPPLISSRCAPPSNKGS 64
DGGK 128
KSDLQAEPYYMQKNTEWYESHGGNLTSGKRDDNLVGGMTLDLPSDAPPISLSGSTNSAS*DGGK 128
VVAATTAQIQEFTKYAGIAATAYCRSVVPGNKWDCVQCQKWVPDGKIITFTSLLSDTNGYVLR 192
VVAATTAQIQEFTKYAGIAATAYCRSVVPGNKWDCVQCQKWVPDGKIITFTSLLSDTNGYVLR 192
SDKQKTIYLVFRGTNSFRSAITDIVFNFSYKPVKGAHVHAGFLSSYEQVVNDYFPVVQEQLTA 256
SDKQKTIYLVFRGTNSFRSAITDIVFNFSYKPVKGAHVHAGFLSSYEQVVNDYFPVVQEQLTA 256
NPTYKVIVTGHS LGGAQALLAGMDLYQREPRLSPKNLSIFTVGGPRVGNPTFAYYVESTGIPFQ 320
NPTYKVIVTGHS LGGAQALLAGMDLYQREPRLSPKNLSIFTVGGPRVGNPTFAYYVESTGIPFQ 320
RTVHKRDIVPHVPPQS S GFLHPGVESWIKSGTSNVQICTSEIETKDCSNSIVPFTSILDHLSYF 384
RTVHKRDIVPHVPPQS F GFLHPGVESWIKSGTSNVQICTSEIETKDCSNSIVPFTSLLDHLSYF 384
DINEGSCL 392
DINEGSCL 392
```

Figura 4. Alinemamiento de la secuencia de aminoácidos de la ROL (Pre, Pro y ROL madura, AAF32408.1) (encontrado) y la obtenida de la traducción de la secuencia del vector pPICFLD- $\alpha$ ROL proveniente del clon de *E.coli* DHFLD\_1. \*): Inicio de la ROL madura. En rojo/amarillo: cambio de aminoácido.

Las propiedades químicas de estos dos aminoácidos son muy distintas. La F, fenilalanina, es un aminoácido de mayor tamaño molecular, con cadenas aromáticas laterales, que contienen un grupo fenílico y de carácter muy hidrofóbico. Sin embargo, la S, serina, es una molécula

menor, que contiene un grupo hidroxilo, y que posee, por lo tanto, un carácter marcadamente hidrofílico.

La F214 no forma parte del centro activo de la lipasa. No obstante, la estructura tridimensional de la ROL posee tres puentes disulfuro, uno de los cuales se forma entre la C (cisteína) 29 y 268, y que es esencial para la estabilidad y actividad de la proteína (Beer *et al*, 1996). La F214, según la estructura tridimensional de la proteína, queda en la vecindad de la formación de dicho puente disulfuro y del centro catalítico (Beer *et al.*, 1996).

Por lo tanto, la sustitución de este residuo por uno de características químicas y tamaño molecular distintos (como es la S) puede haber afectado la estructura tridimensional de la ROL y su actividad.

#### 3.3.2.2.- Cultivos en erlenmeyer de la cepa X-33/FLDROL2\_1

Para comprobar empíricamente si la sustitución F214/S214 afecta la actividad lipolítica de la ROL, se realizaron cultivos en erlenmeyer, según la combinación de sustratos que se indica en materiales y métodos, con las cepas X33/FLDROL\_1, 5, 7 y 8, junto con la control X33/ROL. Los cultivos crecieron durante 48 h hasta alcanzar unas  $DO_{600}$  entre 8-10. Sin embargo, en ninguno de los cultivos, excepto en el control X33/ROL, se detectó actividad lipolítica. Por lo tanto, se procedió a la sustitución completa del gen *ROL* del pPICFLD $\alpha$ -ROL por el gen *ROL* de pPICZ $\alpha$ A-ROL, utilizando los sitios de restricción *EcoRI* y *NotI*, que flanquean el gen (Resina, D, UAB). Se obtuvo un nuevo vector denominado pPICFLD $\alpha$ -ROL2, el cual se utilizó para la nueva transformación de *P. pastoris*, aislándose la cepa X-33/FLDROL2\_1.

Los resultados obtenidos del cultivo en erlenmeyer de la cepa X-33/FLDROL2\_1, con la misma combinación de sustratos descrita, se resumen en la figura 5 (D. Resina, UAB).

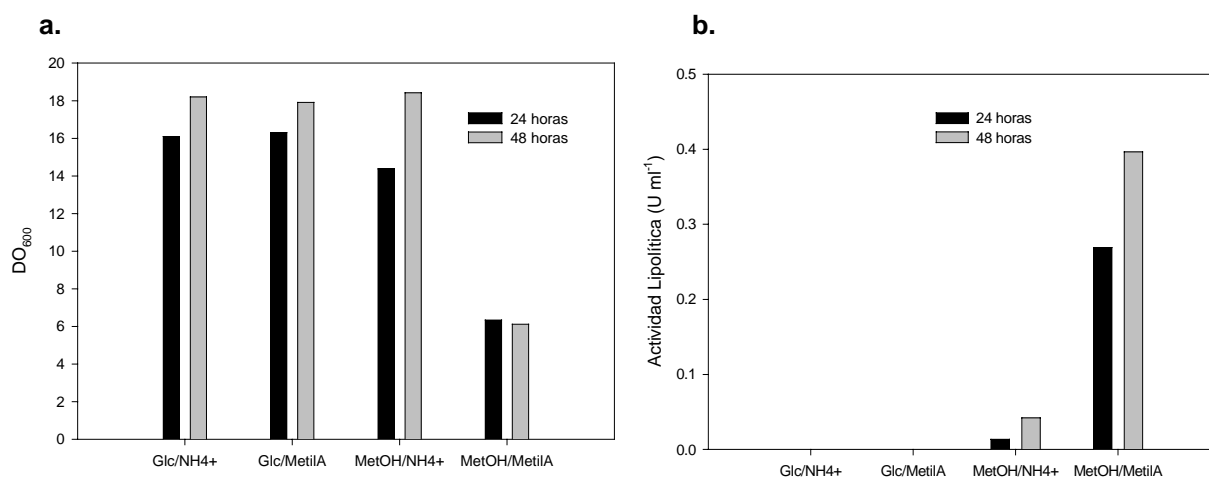


Figura 5.- a) Crecimiento de la cepa X-33/FLDROL2\_1 en cada una de las combinaciones de medio citadas. b): Resultados de actividad lipolítica detectada en los caldos de cultivo, a las 24 y 48 h de cultivo, en cada uno de los medios

Tal y como se observa en la figura 5, los mejores resultados de expresión corresponden a la combinación metanol y metilamina, debido precisamente a que ambos substratos son inductores de la expresión del gen *FLD1*. Resultados similares se obtuvieron en la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa bajo el  $P_{FLD1}$  en *P. pastoris* (Shigang *et al*, 1998). No obstante, hay que remarcar que la glucosa tiene un efecto represor muy fuerte sobre el metabolismo de asimilación del metanol, que es una de las vías de activación del  $P_{FLD1}$ .

El estudio de la vía de asimilación de las metilaminas en la levadura metilotrófica *H. polymorpha* revela que éstas se asimilan mediante vías similares a la asimilación del metanol (Zwart *et al.*, 1983). La oxidación de las metilaminas depende de la enzima metilamina oxidasa, cuyos niveles de expresión dependen de las condiciones de crecimiento de la célula, y están favorecidos en condiciones de limitación de los substratos glucosa y amonio (Zwart *et al.*, 1983). Por lo tanto, posiblemente la combinación de otras fuentes de carbono distintas a la glucosa con metilamina, como fuente de nitrógeno, resultarían más satisfactorias en cuanto a los niveles de transcripción alcanzados por el  $P_{FLD1}$ .

D. Resina (UAB) trabajó sobre esta última hipótesis, realizando cultivos a baja densidad celular utilizando la combinación de substratos de carbono y nitrógeno, sorbitol y metilamina. Se escogió el sorbitol, como fuente de carbono, basándose en el hecho de que éste es el substrato por excelencia no represor de la vía de asimilación del metanol, según la bibliografía. Los resultados de actividad lipolítica obtenidos en los cultivos realizados con la combinación de sorbitol y metilamina indican un nivel de expresión de la ROL más elevado que el conseguido bajo la expresión del  $P_{AOX1}$ , con la combinación de substratos metanol y amonio, en cultivos en *batch* a baja densidad celular (D. Resina, UAB).

Así pues, parece ser que el sistema de expresión de la ROL, bajo el  $P_{FLD1}$ , es una alternativa interesante para la producción de enzimas recombinantes en la levadura *P. pastoris*, obteniéndose resultados satisfactorios de producción en cultivos de baja densidad celular, que resultan prometedores para realizar su estudio en condiciones de bioreactor.

### 3.4 CONCLUSIONES

1. Se ha observado un posible efecto tóxico de la expresión de la ROL en *P. pastoris* en las primeras etapas del crecimiento, a través de la expresión constitutiva de la lipasa. La utilización del  $P_{GAP}$ , por lo tanto, no es una vía alternativa a la utilización del  $P_{AOX1}$  para la expresión de la ROL madura en *P. pastoris*. La expresión constitutiva de la ROL parece afectar la viabilidad celular de la célula hospedadora y los niveles de expresión de la proteína heteróloga alcanzados bajo este sistema son próximos al límite de detección del ensayo

2. Se ha construido un vector de expresión para el clonaje de genes heterólogos en *P. pastoris* bajo el control del  $P_{FLD1}$ , inducible por los substratos metanol y/o metilamina. Este vector ofrece la posibilidad de estudiar la expresión de proteínas heterólogas evitando la utilización del metanol como substrato inductor de la expresión.
3. Los efectos de represión de la glucosa sobre el nivel de transcripción  $P_{AOX1}$  parecen ser extensibles al  $P_{FLD1}$  en la levadura metilotrófica *P. pastoris*, como había estado sugerido en *H. polymorpha*. La expresión de la ROL bajo el  $P_{FLD1}$  podría requerir concentraciones limitantes de glucosa, como fuente de carbono, o la utilización de fuentes de carbono alternativas a ésta.
4. Los resultados preliminares obtenidos en este capítulo sugieren que el sistema de expresión basado en el  $P_{FLD1}$  de *P. pastoris* puede ser una alternativa viable para la expresión de la ROL a elevadas densidades celulares sin la utilización del metanol como substrato inductor. No obstante, no existen estrategias de *fed-batch* diseñadas bajo este sistema, lo cual supone la principal dificultad para el seguimiento y control de la adición del substrato inductor (metilamina) durante la etapa de *fed-batch*.



## **CAPÍTULO 4.- Obtención de una lipasa de *Rhizopus oryzae* recombinante: generación de la proteína de fusión MBP-ROL y purificación por cromatografía.**

### **4.1 INTRODUCCIÓN**

El desarrollo experimentado a lo largo de las últimas décadas de las técnicas de biología molecular e ingeniería genética, no se ha dirigido tan sólo hacia la optimización de la expresión de proteínas recombinantes de elevado interés humano, sino que, paralelamente, también se ha enfocado hacia el estudio de nuevas herramientas moleculares que faciliten la purificación de las mismas. En este contexto se enmarcan los sistemas de expresión de proteínas de fusión.

Los sistemas de expresión de proteínas de fusión permiten el ensamblaje de la proteína de interés con otra proteína, o fragmento proteico (contenido en el vector de expresión), que está bien caracterizado y que ofrece aplicaciones particularmente ventajosas. La proteína de fusión generada presenta las mismas características que los productos genéticos originales.

Algunas de las aplicaciones de los sistemas de expresión de proteínas de fusión son, por ejemplo, la monitorización de la expresión y/o localización de las proteínas recombinantes a las que se han unido, el aumento de la vida media de circulación en sangre de determinadas proteínas de interés terapéutico o el incremento de la estabilidad de las mismas a los ataques proteolíticos. Sin embargo, la principal aplicación de las proteínas de fusión en biotecnología es, sin duda, facilitar la purificación de las proteínas recombinantes.

La purificación de las proteínas de fusión se consigue, generalmente, a través de un único paso de cromatografía de afinidad, el cual está definido por las características particulares del fragmento (o proteína) de fusión propio del vector hacia una determinada matriz o resina. Existen diferentes fragmentos o proteínas de fusión descritos con éxito en la literatura para la obtención y purificación de proteínas recombinantes. Todos estos sistemas están desarrollados, principalmente, en base a alguno de estos tipos de interacción: enzima/proteína-substrato, receptor-proteína, anticuerpo-antígeno o afinidad del fragmento de fusión por los metales.

En concreto, el sistema de la *maltosa-binding-protein* (MBP), está basado en la elevada afinidad de esta proteína de *E. coli* (la MBP) por los polímeros de glucosa de unión  $\alpha(1-4)$  de hasta 7 u 8 residuos (maldodextrinas). La MBP es una proteína soluble de 40 kDa de peso molecular codificada por el gen *malE* de *E. coli*. La MBP se encuentra a concentraciones

elevadas en el periplasma de la célula, debido a que es la responsable de la interacción con los residuos de azúcar citados para facilitar su transporte a través de la membrana citoplasmática.

El sistema de purificación de la MBP fue originariamente diseñado por Guan *et al* (1986), los cuales construyeron los primeros vectores de expresión de este sistema que permite clonar el gen de interés en posición 3' del gen que codifica para la MBP (*malE*). La proteína de fusión originada se purifica a través de un único paso de cromatografía de afinidad por unión de la MBP a una resina de amilosa, y se consigue su posterior elución por competencia con maltosa.

En la actualidad, el sistema de purificación de la MBP está comercializado por la compañía *New England Biolabs*, y ofrece una gama versátil de diferentes vectores que incluyen distintos componentes, como una señal de secreción (para la expresión extracelular de las proteínas de fusión), o un sitio de reconocimiento específico para proteasas (en concreto, el Factor Xa) que permite la separación última de la proteína recombinante de la MBP.

Los componentes de un vector genérico, basado en el sistema de la MBP son los siguientes: un promotor de expresión fuerte, el *P<sub>tac</sub>*, un sitio de inicio de transcripción propio del gen *malE*, un *polylinker* o sitio de clonaje del gen de interés el cual está en posición 3' del gen *malE* que codifica para la MBP y en cuya posición 5' puede incluir un sitio específico de reconocimiento proteolítico, en concreto el del Factor Xa. Por último, estos vectores también incluyen el gen *Lac9* que codifica para el represor lac que mantiene bajos los niveles de transcripción del *P<sub>tac</sub>* a menos que no haya presencia de del substrato inductor (IPTG) en el medio.

El sistema de proteínas de fusión de la MBP fue el seleccionado para la purificación del fragmento C-terminal, de 420 bp, de la lipasa de *Rhizopus oryzae*, ROL. El propósito de la purificación y obtención de este fragmento es la generación de anticuerpos específicos para la ROL que pudieran utilizarse en posteriores estudios de transducción de señal en la expresión recombinante de la ROL en la levadura *P. pastoris*.

Hay que remarcar que en el proceso de construcción del vector de expresión del gen *ROL* utilizado a lo largo de este trabajo (pPICZ $\alpha$ A-ROL) (Minning *et al.*, 1998), se introdujo un codón de STOP en posición C-terminal del gen *ROL*, lo que imposibilita la purificación de la ROL mediante la utilización la cola de seis histidinas en posición C-terminal propia del vector (ver figura1, página 29). La utilización del sistema de proteínas de fusión de la MBP plantea un camino más corto y rápido, a escala de laboratorio, respecto a la reconstrucción del vector pPICZ $\alpha$ A-ROL en *P. pastoris*, para la purificación de la ROL y la posible generación de anticuerpos específicos contra ésta.

La figura 1 representa un esquema de la generación del producto MBP-ROL.

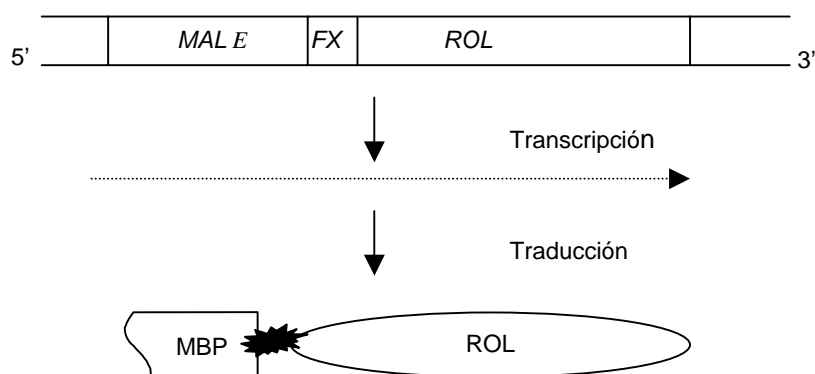


Figura 1. Representación esquemática de la generación de la proteína de fusión MBP-ROL.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en la purificación de el fragmento C-terminal de la ROL bajo el sistema de la MBP, con el propósito de generar anticuerpos específicos para éste.

Paralelamente, este capítulo también recoge los resultados obtenidos en el proceso de recuperación y purificación de la ROL recombinante obtenida en el sobrenadante de los cultivos en *fed-batch* realizados con medio sintético, descritos en los capítulos anteriores de este trabajo. Básicamente, la definición de una estrategia de proceso no se basa tan sólo en la elaboración de una metodología de producción satisfactoria, sino que implica el desarrollo e integración de un protocolo eficaz de recuperación del producto, es decir, con un rendimiento satisfactorio para la aplicación concreta para la cual el producto se ha generado. A lo largo del siguiente capítulo se describe el protocolo desarrollado para la recuperación de la ROL recombinante con un grado de purificación adecuado para la utilización de esta enzima en reacciones de química fina.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 Cepas y vectores.

Se utilizó la cepa comercial de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Life Technologies) y el vector comercial pmalc-2 (New England Biolabs), de expresión intracelular.

### 4.2.2 Mantenimiento de cepas transformadas.

Las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas se mantuvieron en placas de LB agar (10 g de triptona, 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 20 g de agar, por litro de agua destilada), con ampicilina (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), a 4°C, durante semanas y en glicerizados de medio líquido LB con un 10% (w/v) de contenido en glicerol, a -70°C.

### 4.2.3 Construcción del vector pmalc2\_ROL.

#### 4.2.3.1 *Construcción de la secuencia MBP-ROL por PCR (Polymerase chain reaction).*

La secuencia de C-terminal de 420 pb de la ROL (incluyendo el triplete de terminación del gen ROL) se amplificó mediante PCR. Se diseñaron y utilizaron para tal propósito los oligonucleótidos 5'ROLMBP (5'-GCCGGATCCTCTTACAACGGGAACCAAAAC-3') y 3'ROLMBP (5'-GCCCTGCAGTGATGGTCGACGCGCTATTC-3'), que introducen los sitios de restricción *Bam*HI y *Pst*I (subrayados) en posición 5' y 3' del producto amplificado respectivamente. La PCR se realizó utilizando 100 ng de DNA molde (pPICZA $\alpha$ -ROL), dNTPS (200  $\mu$ M cada uno), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l de cada uno de los oligonucleótidos a una concentración de 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, y la enzima *Taq* polimerasa. Se utilizaron las temperaturas de 94°C para desnaturalización (10 minutos), y durante 25 ciclos, 94°C (1 minuto), 53°C (1 minuto) y 72°C (1 minuto), como temperaturas de desnaturalización, hibridación y elongación respectivamente, más 10 minutos posteriores de elongación a 72°C. El producto de PCR se purificó mediante el *PCR purification kit (Qiagen)* según el protocolo recomendado por el suministrador, y se recuperó del gel de agarosa al 1% (w/v), en TAE 1X mediante el *Qiagen Extraction kit (Qiagen)*.

El producto purificado de PCR y el vector pmalc-2 (*New England Biolabs*) se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I, durante 2 h a 37°C. Se determinó la concentración de DNA mediante lectura de la absorbancia a 260 nm y se realizó la ligación de ambos productos durante 15 h, a temperatura ambiente, utilizando la relación molar 10 X (inserto: vector) y 1  $\mu$ l de enzima ligasa T4 (*Roche Diagnostics*).

### 4.2.4 Transformación.

Las células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (*Life Technologies*) se transformaron mediante choque térmico a 42°C con el vector pmalc2\_ROL. Los clones transformados fueron seleccionados en placas de LB (ver 4.2.2, pág. 93) con 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de ampicilina. La presencia del inserto MBP-ROL se comprobó mediante digestión enzimática con las enzimas *Bam*HI y *Pst*I.

### 4.2.5 Secuenciación.

Para la secuenciación de la construcción MBP-ROL se diseñaron los oligonucleótidos 5'MBPROL, con secuencia: (5'-GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC-3') y 3'MBPROL (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'), y la secuenciación se llevó a cabo el servicio de secuenciación de la Universitat Autònoma de Barcelona (Departament de Bioquímica).

### 4.2.6 Medios de cultivo.

El medio utilizado para el cultivo líquido de las células de *E. coli* transformadas con el pmalc2\_ROL contiene, por litro de agua destilada: 10 g de Triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 2 g de glucosa y una concentración final de ampicilina de 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>.

La solución *stock* de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosidasa) 0.1 M se preparó mediante la disolución de 1.41 g de IPTG en 50 ml de agua destilada, y se filtró a través de filtros *Millipore-GV PVDF*, de baja absorción proteica, de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

Se utilizó el *cocktail* de inhibidores de proteasas de *Sigma*.

#### 4.2.7 Recuperación y purificación de la ROL recombinante.

##### 4.2.7.1. *Recuperación de la ROL: Obtención del extracto crudo de ROL.*

El proceso de recuperación de la lipasa se inició mediante centrifugación del caldo de cultivo a 6000 rpm durante 30 minutos para eliminar la biomasa. Posteriormente, el sobrenadante se filtró a través de filtros *Millipore-MF* de 0.45  $\mu\text{m}$  de corte de membrana para eliminar los posibles restos de biomasa. El sobrenadante se concentró utilizando un sistema de ultrafiltración *Minitan®* (*Millipore*) equipado con membrana de filtración tangencial de 10 kDa de corte. El concentrado se resuspendió en 5 l de una solución Tris-HCl 20 mM, pH 8.1, y se dializó y concentró hasta un volumen final de 100 ml, utilizando el mismo equipo. El líquido concentrado final se liofilizó (liofilizador *Virtis Sentry™ Benchtop 5 l*) durante 24 h hasta obtener un producto sólido. A este liofilizado de ROL se le denominó extracto crudo de ROL.

##### 4.2.7.2. *Purificación del extracto crudo de ROL por cromatografía.*

El sistema de cromatografía utilizado fue el *Pharmacia FPLC system* (*Fast Protein Liquid Chromatography*).

##### 4.2.7.2.1. *Cromatografía de intercambio catiónico.*

###### 4.2.7.2.1.1. *Preparación de la muestra.*

El extracto crudo de ROL se obtuvo tal y como se especifica en el apartado anterior. El extracto crudo de ROL se resuspendió en agua destilada estéril (50 mg de liofilizado de ROL  $\text{ml}^{-1}$ ) y posteriormente se dializó contra  $\text{CaCl}_2$  10 mM, pH 6.00, durante 24 h. La muestra se centrifugó a 12000 xg durante 20 minutos a 4°C. Finalmente la muestra se filtró utilizando filtros *Millipore-GV PDVF* de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

###### 4.2.7.2.1.2. *Inyección de la muestra.*

La columna de intercambio iónico utilizada fue la *SP sepharose XK2620* (de 26 mm de diámetro y 75 ml de volumen de columna) (*Pharmacia*). La columna se equilibró con la misma solución de  $\text{CaCl}_2$  10 mM, pH 6.00, en la que se encuentra resuspendida la muestra de extracto crudo de ROL. El flujo de trabajo en la columna fue de 1.5  $\text{ml min}^{-1}$  y se recogieron fracciones de 5 ml de volumen. El esquema de trabajo comprende: 2 volúmenes de columna (tras la inyección de la muestra) en las condiciones citadas y, posteriormente, un volumen de columna realizando un gradiente de 0 a 1.0 M de NaCl (en  $\text{CaCl}_2$  10 mM, pH 6.00). Esta concentración de NaCl se mantuvo durante dos volúmenes más de columna.

### *4.2.7.2.2. Cromatografía de interacción hidrofóbica.*

#### *4.2.7.2.2.1. Preparación de la muestra*

Se recogió un volumen de 30 ml eluidos de la cromatografía de intercambio catiónico que contenían actividad lipolítica. Estos 30 ml se concentraron mediante concentradores *Centrikon-10 (Millipore)* de 15 ml de capacidad y un corte de membrana de 10.000 Da, hasta un volumen final de 5 ml que se utilizó para su aplicación en la columna de interacción hidrofóbica.

#### *4.2.7.2.2.2. Inyección de la muestra*

Se utilizó una columna de *Phenyl sepharose (Pharmacia)* de 10 ml de volumen de columna. La columna se equilibró con una solución de NaCl 1.0 M. La inyección de la muestra se realizó a un caudal de 0.5 ml min<sup>-1</sup>, y posteriormente se aplicó un volumen de columna de la misma solución tampón a un flujo de trabajo de 1 ml min<sup>-1</sup>, recogiendo fracciones de 5 ml de volumen. La elución de la muestra se realizó mediante un gradiente decreciente del tampón NaCl 1.0 M de 100 a 0 % de concentración, en agua destilada, a lo largo de un volumen de columna, operando al mismo flujo de trabajo, y una posterior aplicación, durante 15 minutos, de un caudal constante de 1 ml min<sup>-1</sup> de 1% Triton X-100. El detergente se lavó mediante centrifugaciones sucesivas de la fracción eluida utilizando concentradores *Centrikon-10 (Millipore)* de 15 ml de capacidad y un corte de membrana de 10.000 Da.

### *4.2.7.3. Purificación de la construcción MBP-ROL por cromatografía de afinidad.*

#### *4.2.7.3.1. Preparación de la muestra.*

El cultivo de células de *E. coli* se centrifugó a 4000 xg, durante 20 minutos a 4°C, y se descartó el medio líquido. El *pellet* de células obtenido se resuspendió en 50 ml de tampón de columna (ver siguiente apartado para su composición) y se congeló durante 24 h a -70 °C. Posteriormente, las células se descongelaron en un baño de agua fría y se procedió a su sonicación durante 12 ciclos de 15 segundos de sonicación, más otros 15 segundos de reposo de las muestras en hielo. Se siguió la liberación de proteína mediante el test colorimétrico de *Bradford*. Posteriormente, la muestra celular se centrifugó a 9000 xg, durante 30 minutos, a 4°C, recogándose el sobrenadante.

#### *4.2.7.3.2. Inyección de la muestra.*

Se utilizó una columna de 1 ml de volumen relleno de resina de amilosa (# 800-21S de *New England Biolabs*), con una capacidad de unión de proteína de 3 mg ml<sup>-1</sup>. El tampón de columna utilizado contiene, por litro de agua destilada: 10 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7.4, 11.7 g de NaCl y 2 ml de EDTA 0.5 M. El tampón de elución posee la misma composición más una concentración 10 mM de maltosa. La columna se equilibró con el tampón de columna sin maltosa durante 8 volúmenes de columna a un caudal de 1 ml min<sup>-1</sup>. Se utilizó un flujo de trabajo de 0.5 ml min<sup>-1</sup> para la inyección, y se realizaron 12 lavados de columna, a este mismo caudal posteriormente a la inyección de la muestra. El flujo de elución fue de 1 ml min<sup>-1</sup>, recogándose en fracciones de 500 µl de volumen.

4.2.8. Métodos analíticos.

4.2.8.1. *Análisis de actividad lipolítica.*

Se utilizó el ensayo colorimétrico del PNPL (paranitrofenol laureato) como seguimiento cualitativo de la actividad lipolítica durante el proceso de cromatografía, debido a que es un método sencillo, rápido y puede realizarse utilizando pequeños volúmenes de muestra en microplaca. El ensayo consiste en la mezcla de 10  $\mu$ l de muestra a analizar con 100  $\mu$ l de solución de reacción, que en presencia de actividad lipolítica se torna de color amarillo, por la liberación del laureato. La solución de reacción está compuesta por una combinación, en relación 1: 9 (v/v), de una solución de 51 mg de PNPL en 20 ml de isopropanol puro (sonicada durante 30 segundos), y una segunda solución de 1 g de Triton X-100 y 0.2 g de goma arábica en 200 ml de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5. Para la cuantificación de la actividad lipolítica, una vez detectadas las fracciones en las que se recupera la lipasa, se utilizó el ensayo colorimétrico comercial de determinación de la actividad lipolítica LIP de *Roche Diganostics* (página 61, apartado 2.2.7.2).

4.2.8.2. *Análisis de proteínas.*

La cuantificación de la concentración de proteína total se llevó a cabo mediante el ensayo colorimétrico de *Bradfort* según las especificaciones descritas por el autor (Bardfort M., 1976).

4.2.9. SDS-PAGE

Los gels de electroforesis de proteínas se realizaron a un 12 % (w/v) de poliacrilamida, bajo condiciones desnaturizantes y un voltaje de 70-80 v constante, utilizando el equipo *Mini Protean II cell vertical* (*Bio Rad*). La visualización de las proteínas se realizó mediante tinción de *Comassie* y tinción de plata (según especificaciones de *Bio Rad*). Los marcadores de peso molecular de proteína *SDS-Broad Range* (*Bio Rad*).

### **4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.3.1. GENERACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN MBP-ROL Y PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.**

Para la generación de la proteína de fusión MBP-ROL se amplificaron, por PCR, 420 bp en posición C-terminal de la ROL (que incluyen el triplete de terminación del gen *ROL*), utilizando los oligonucleótidos 5' MBPROL y 3' MBPROL (ver materiales y métodos 4.2.3.1. de este capítulo, página 94). Estos oligonucleótidos incluyen los sitios de restricción *Bam*HI y *Pst*I, en posición 5' y 3' del fragmento amplificado, respectivamente. La figura 2 ilustra el producto obtenido, de tamaño molecular de 420 bp.

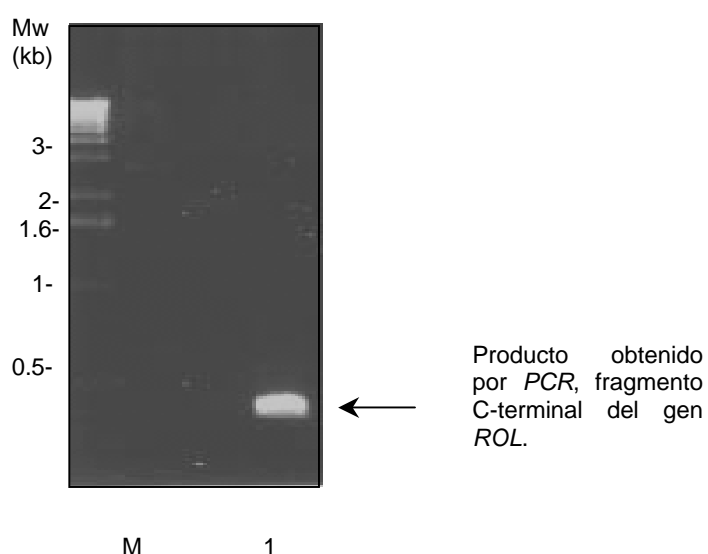


Figura 2. Gel de 1 % (w/v) de agarosa del (1): producto de PCR obtenido a partir de la amplificación del gen *ROL* con los oligonucleótidos 5' MBPROL y 3' MBPROL (señalado por la flecha en negro). **M**: marcadores de peso molecular (kb).

El producto purificado se insertó en el vector *pMalc-2*, utilizando los sitios de restricción citados, generándose el vector *pMalc2\_ROL*, con el que transformaron las células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se obtuvo un tapiz de células transformantes del que se escogió, posteriormente a la verificación de la correcta inserción y secuenciación del fragmento clonado, el clon DH/MBPROL\_7 para la expresión de la proteína de fusión. La proteína de fusión generada posee un peso molecular teórico de 54.20 kDa (40 kDa de la MBP más 14.20 kDa procedentes de los 420 bp de la *ROL* fusionados).

Se realizó un cultivo a pequeña escala de 80 ml de la cepa en medio rico, con glucosa y ampicilina para comprobar la expresión de la proteína de fusión. La inducción de la expresión de la MBP-ROL se realizó mediante IPTG, a una concentración final de 0.3 mM, al alcanzar el cultivo una DO<sub>600</sub> de 1.2-1.5 y durante tres horas. Se recogieron muestras a lo largo del cultivo,



previamente a la inducción, y después de 1, 2 y 3 horas de inducción. Las muestras celulares (obtenidas según 4.2.7.3.1, página 96) se visualizaron realizando un gel de proteínas (ver figura 2). Paralelamente, la última muestra (3 horas de inducción) se resuspendió en 50  $\mu$ l de tampón de columna y se mezcló con 50  $\mu$ l de resina de amilosa, previamente lavada con el mismo tampón, para comprobar a pequeña escala la afinidad de la proteína de fusión por la resina. La mezcla de proteína y amilosa se dejó a 4°C durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 4000 xg durante 1 minuto, recuperándose el *pellet* de amilosa que se resuspendió en el tampón de carga SDS-PAGE. La figura 3 ilustra los resultados obtenidos en este proceso.

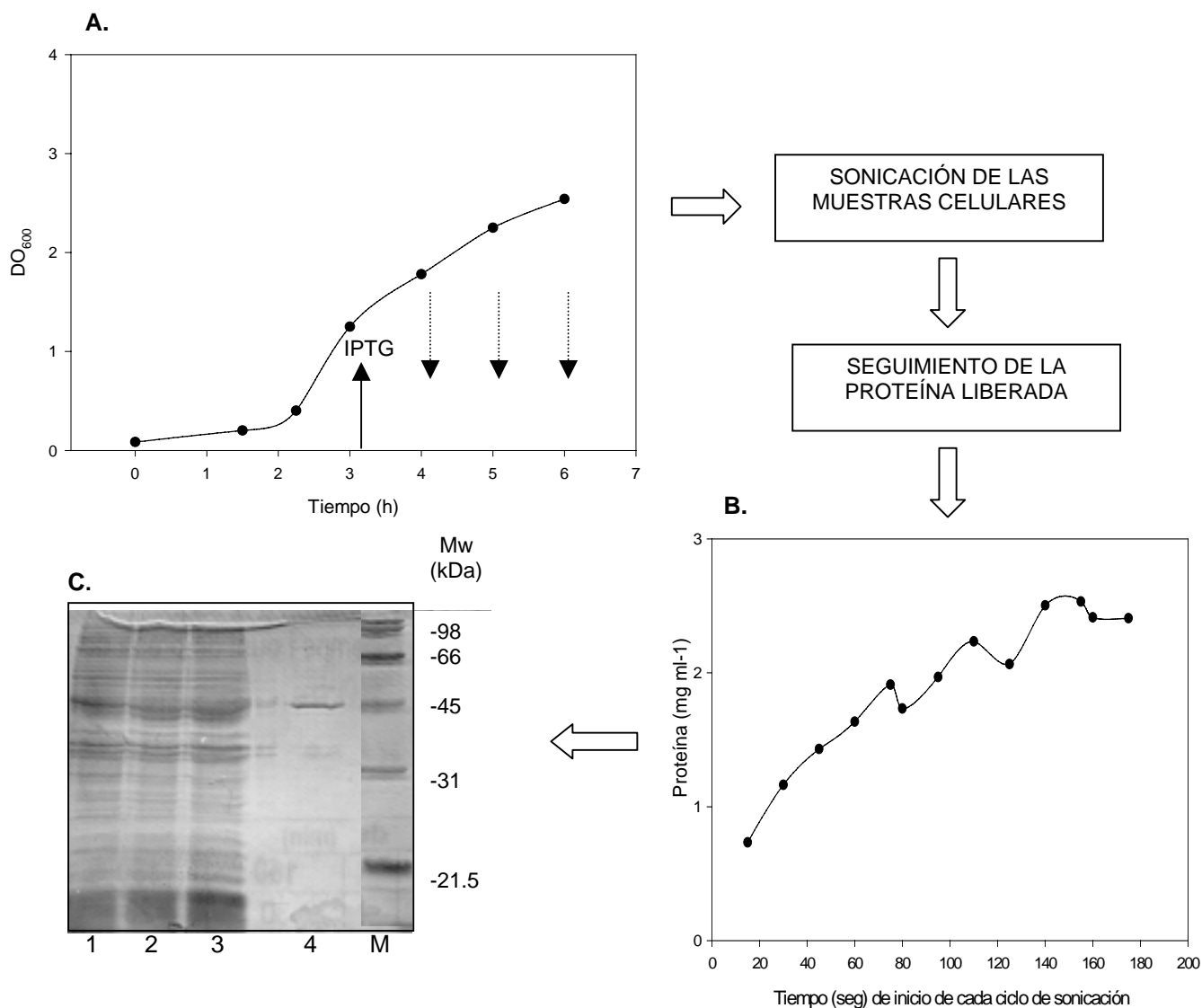


Figura 3. **A:** Representación del crecimiento de la cepa DH/MBPROL\_7 e inducción, mediante la adición de IPTG 0.3 mM (señalado por la flecha vertical negra) de la expresión de la MBP-ROL. Las flechas discontinuas indican las muestras recogidas a 1, 2 y 3 horas post-inducción. **B:** Seguimiento de la liberación de proteína intracelular (mediante el test de Bradford) de las muestras durante la sonicación. **C:** SDS-PAGE de las muestras de cultivo: (1) previamente a la inducción, (2) después de 2 horas de inducción con IPTG, (3) después de 3 horas de inducción y (4): muestra de después de 3 horas de inducción e incubación con la resina de amilosa. **M:** marcadores de peso molecular de proteína. Tinción de *Comasie*. Peso molecular de la MBP: 40 kDa, y de la MBP-ROL: 54.20 kDa.

El carril 4 de la figura 3.C muestra claramente la unión específica de una proteína de aproximadamente 45 kDa a la resina de amilosa, que no se corresponde con el peso molecular esperado de la proteína MBP-ROL (54.20 kDa). Probablemente estas diferencias respecto a peso molecular podrían deberse a la actividad proteolítica liberada durante la posible disrupción de las células. Además, se observa, a lo largo de la inducción el aumento de una banda, de peso muy inferior a 21.5 kDa, que podría deberse a parte de esta degradación. La tinción de plata (mucho más sensible que la de *Comasie*), en gel de electroforesis de la muestra correspondiente a la unión con la resina de amilosa, apunta hacia esta posibilidad (ver figura 4). Como se observa en la figura 4, existe una fracción de proteína unida a la resina de amilosa que podría corresponder con el peso molecular esperado de la MBP-ROL (de 54.20 kDa aproximadamente), sin embargo, existe una evidente degradación proteolítica.

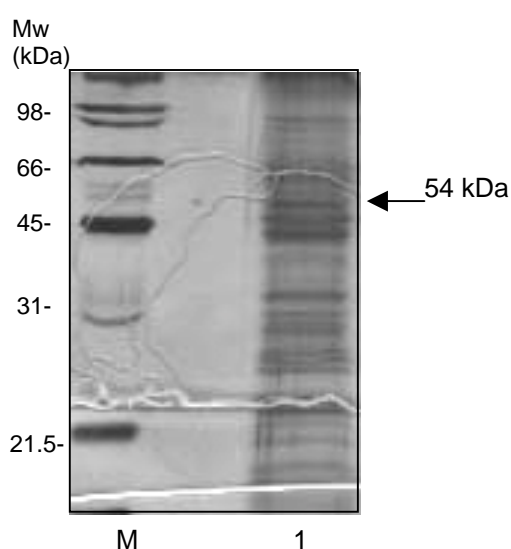


Figura 4. 1: SDS-PAGE de la muestra de cultivo de tres horas de inducción con IPTG posteriormente a su unión con la resina de amilosa. **M**: Marcadores de peso molecular de proteínas (kDa). La flecha en negro señala el peso molecular aproximado esperado para la construcción de la MBP-ROL. Tinción de plata.

Bajo estas observaciones, se realizó un cultivo de 500 ml de volumen utilizando la misma cepa de *E. coli* DH/MBPROL\_7 para la purificación de la MBP-ROL, añadiendo inhibidores de proteasas (*cocktail* de inhibidores de *Sigma*) en el medio de cultivo, así como en el tampón de columna utilizado para la resuspensión de las muestras celulares durante el proceso de disrupción celular por sonicación.

La muestra obtenida de la disrupción celular se aplicó a una columna de amilosa de 1 ml de volumen equilibrada previamente con el mismo tampón de columna. Se realizó la inyección y elución de la muestra tal y como se describe en el apartado 4.2.7.3.2 de materiales y métodos de este capítulo. La figura 5 corresponde al gel de electroforesis de la fracción eluida en el proceso de cromatografía posteriormente a su tratamiento con el Factor proteolítico Xa (según

especificaciones de New England Biolabs), para la liberación de ambos componentes, MBP y ROL.

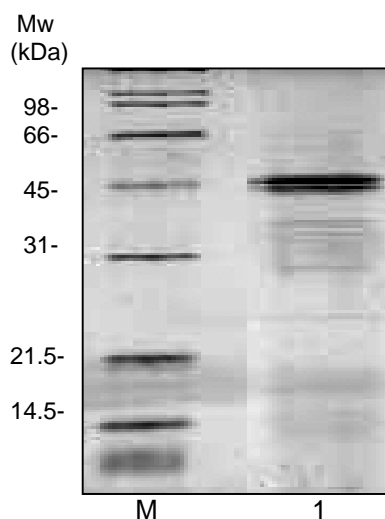


Figura 5. SDS-PAGE de (1): muestra eluida de la cromatografía de afinidad posteriormente a su tratamiento con el Factor Xa. **M**: marcadores de peso molecular de proteínas (kDa). Tinción de *Comassie*.

Los resultados obtenidos siguen indicando la posible proteólisis de parte de la proteína ROL. Son diversos los factores que pueden influir sobre este hecho, el tiempo de inducción, la temperatura, así como otras condiciones propias del proceso de disrupción celular. Por lo tanto, se procedió a la purificación de la ROL recombinante basándonos en las características químicas de la proteína, y se descartó esta vía de purificación.

#### 4.3.2. RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ROL RECOMBINANTE.

Se desarrolló un protocolo de recuperación de la ROL recombinante a partir del sobrenadante procedente de los cultivos realizados en *fed-batch* utilizando un medio sintético (capítulo 1 de la sección E de Resultados y Discusión, página 29).

El caldo de cultivo se centrifugó y el sobrenadante se filtró, dializó, concentró, y liofilizó obteniéndose una muestra cruda de ROL, tal y como se detalla en la sección de materiales y métodos 4.2.7.1 de este capítulo (página 95). El rendimiento de recuperación de la actividad lipolítica global a lo largo de este proceso, hasta la obtención del extracto crudo o liofilizado de ROL se determinó en un 90%.

La posterior purificación de la ROL recombinante se realizó mediante la combinación de dos etapas de cromatografía: en primer lugar un paso de cromatografía por intercambio catiónico

seguido de un paso de cromatografía por interacción hidrofóbica, como se detalla a continuación.

La muestra de extracto crudo de ROL resuspendida en agua destilada (50 mg de extracto crudo de ROL por mililitro) se dializó frente al tampón de carga  $\text{CaCl}_2$  10 mM pH 6.00 previamente a su inyección en la columna de intercambio catiónico (*SP Sepharose*). Esta diálisis es necesaria para asegurar la unión de la ROL a la resina debido a que en la muestra de extracto crudo de ROL existe una elevada concentración de Tris-HCl pH 8.10, y el pI de la lipasa es  $\geq 9.3$  (Minning *et al.*, 1998). La Figura 5 recoge el cromatograma obtenido.

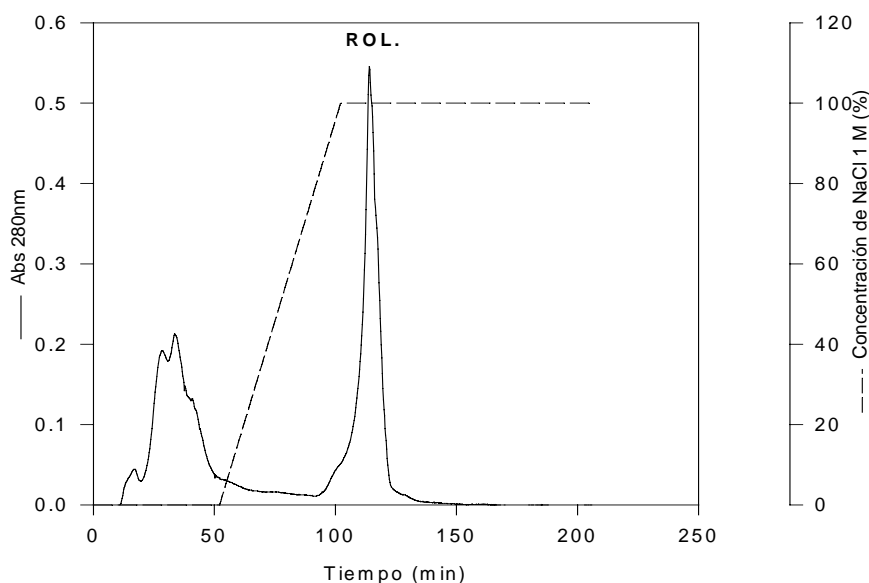


Figura 5. Cromatograma obtenido de la cromatografía de interacción catiónica (*SP Sepharose*) de la muestra de extracto crudo de ROL.

El rendimiento de actividad lipolítica obtenida en este proceso fue aproximadamente del 60 % (ver resumen en la tabla 1, página 104). Sin embargo, los valores de actividad específica recuperada en este primer paso de cromatografía ( $1.95 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ ) fueron menores que aquellos obtenidos en la purificación de la misma proteína procedente de cultivos realizados con medio complejo (Minning *et al.*, 1998).

Esta diferencia podría atribuirse al hecho de que en la muestra de extracto crudo de ROL procedente de cultivos realizados con medio sintético existe un mayor número de contaminantes que en aquellas muestras derivadas de cultivos con medio complejo, como se ilustra en la figura 6.

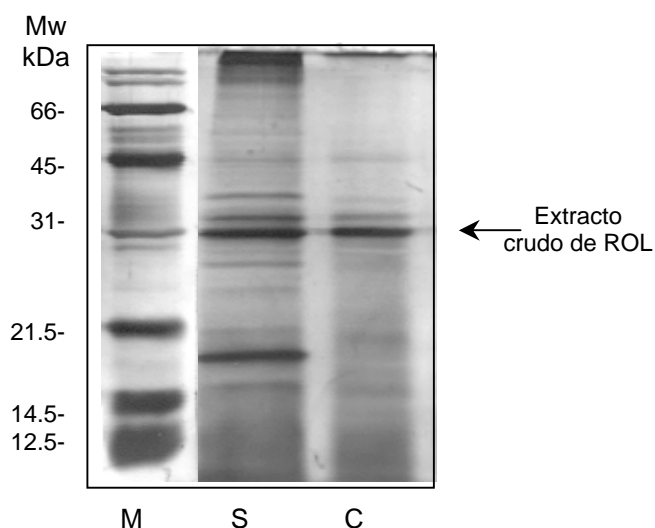


Figura 6. SDS-PAGE de las muestras de extracto crudo de ROL obtenidas de los cultivos realizados con **S**: medio sintético, **C**: medio complejo. **M**: marcadores de peso molecular de proteínas (kDa). Tinción de plata.

El grado de purificación alcanzado tras este primer paso de cromatografía de intercambio catiónico (ver tabla 1, página 104) resultó ser suficiente para algunas de las aplicaciones de la ROL recombinante, en concreto, para llevar a cabo determinadas reacciones enzimáticas interesantes en diversos procesos de química fina (Ferrer *et al.*, 2000).

No obstante, debido a los resultados poco satisfactorios de purificación del fragmento C-terminal de la ROL mediante la proteína de fusión MBP-ROL, se procedió a la mejora de la purificación de la enzima recombinante ROL hasta obtener un grado de purificación adecuado para la generación de anticuerpos.

Por lo tanto, la purificación de la ROL se mejoró en base a la elevada capacidad de interacción hidrofóbica que poseen las lipasas, procediendo a la aplicación de la fracción eluida de la cromatografía de intercambio catiónico en una columna de interacción hidrofóbica, con grupos *Phenil sepharose*.

Las lipasas son enzimas de naturaleza hidrofóbica que se unen específicamente a grupos octil y phenil sepharosa (Rúa *et al.*, 1993). El esquema de trabajo utilizado se basó en el desarrollado para la purificación de diferentes isoformas de lipasas nativas de la levadura *Candida rugosa* (Sánchez *et al.*, 1999), disminuyendo la concentración de sales mediante un gradiente de 100 a 0% de NaCl más un paso posterior de elución con detergente, 1 % Triton X-100.

La tabla 1 recoge, a forma de resumen, los resultados obtenidos para cada una de las etapas de cromatografía citadas.

	Volumen (ml)	Actividad (U ml <sup>-1</sup> )	Actividad (U)	Y <sub>A</sub> (%)	Proteína (μg ml <sup>-1</sup> )	Proteína (μg)	Y <sub>P</sub> (%)	Actividad específica (U μg <sup>-1</sup> )
<b>CE</b>								
Inyección	25	625	15625		2343.7	58583.7		0.26
1er pico	45	100.	4500	28.8	190.6	8578.1	14.6	0.52
ROL	30	312.5	9375	60	159.5	4785	8.1	<b>1.95</b>
<b>HIC</b>								
Inyección*	5	1685	8425		953	4765		1.77
ROL	25	nd	nd		455.53	2277.67	47.8	nd

Tabla 1. Rendimientos obtenidos de la cromatografía de interacción hidrofóbica de la ROL. **CE**: cromatografía de intercambio catiónico. **HIC**: cromatografía de interacción hidrofóbica. **Y<sub>A</sub>**: rendimiento de actividad lipolítica. **Y<sub>P</sub>**: rendimiento de proteína. \*): volumen de inyección que corresponde a la concentración del 2º pico (ROL) obtenido de la cromatografía de intercambio catiónico (CE).

No se detectó actividad lipolítica en las muestras eluidas, debido a la inactivación resultante del Triton X-100 (Hiol *et al.*, 2000). Sin embargo, se realizó la posterior eliminación de este detergente mediante centrifugación de la muestra y resuspensión en agua destilada utilizando los concentradores *Centrikon* (Millipore) de 10 kDa de corte de membrana, como se detalla en materiales y métodos 4.2.7.2.2.2 de este capítulo. Se comprobó, por SDS-PAGE, la presencia y pureza de una única banda de proteína correspondiente al peso molecular esperado de la ROL, la cual se utilizó, posteriormente, para la generación de anticuerpos específicos contra la misma.

Hay que destacar, no obstante, que debido a la inactivación de la ROL, este proceso no resulta adecuado como metodología de purificación de la ROL recombinante a mayor escala. Sin embargo, resultó suficiente para la posible obtención de una muestra de ROL con un grado de pureza adecuada para la generación de anticuerpos contra ésta.

#### **4.4. CONCLUSIONES**

1. Se ha obtenido la proteína de fusión MBP-ROL, de secuencia correcta, expresada de forma intracelular en la cepa de *E. coli* DH/MBPROL\_7. Sin embargo, no se han desarrollado las condiciones adecuadas para la purificación de la proteína de interés, debido posiblemente, a la acción de proteasas endógenas de la célula.

2. Se ha desarrollado un protocolo de recuperación de la ROL desde el caldo de cultivo hasta la obtención de un extracto crudo o liofilizado final de ROL, con un rendimiento de recuperación de la actividad lipolítica final del 90 %.
  
3. Se ha llevado a cabo la purificación parcial de la ROL recombinante mediante un único paso de cromatografía de intercambio catiónico, obteniéndose un grado de purificación final adecuado para la utilización de la lipasa en reacciones de química fina (Ferrer *et al*, 2000). Además, la combinación de un segundo paso de cromatografía de interacción hidrofóbica ha resultado en la purificación de la ROL recombinante con un grado de pureza que permite la utilización de la proteína para la generación de anticuerpos contra ésta.





## F. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GLOBALES.

---

En este trabajo se han abierto diferentes líneas de investigación sobre el estudio de la expresión recombinante de una lipasa de *R. oryzae* en la levadura *P. pastoris*. Este capítulo pretende recopilar e integrar los resultados hasta aquí presentados y discutidos por separado, así como apuntar hacia las posibilidades de estudio en un futuro, algunas de las cuales ya están en curso

Entre todas las estrategias exploradas en este trabajo para **la optimización del proceso de producción recombinante de la ROL bajo el  $P_{AOX1}$ , sólo se ha conseguido su mejora mediante la modificación de la estrategia de cultivo en *fed-batch***, utilizando la cepa de una única copia del gen *ROL* (capítulo 1 de la sección E de Resultados y Discusión, página 29).

Se ha demostrado que **el seguimiento de la presión parcial del oxígeno en el caldo de cultivo, como parámetro indicativo del consumo de metanol durante la etapa del *fed-batch*, no es suficiente para asegurar la robustez del proceso de producción**. En el sistema de expresión de proteínas de *P. pastoris* bajo el  $P_{AOX1}$ , es imprescindible que no se acumule el metanol en el caldo de cultivo a concentraciones elevadas durante largos periodos de tiempo. En este trabajo, se escogió un valor de concentración máxima de metanol de  $5 \text{ g l}^{-1}$ , según recomendaciones bibliográficas, y se ha comprobado los efectos beneficiosos que este hecho tiene sobre la producción del sistema. Los efectos tóxicos del metanol *per se*, y de los productos que se originan de su metabolismo (formaldehído y ácido fórmico, principalmente) pueden afectar a la capacidad de las levaduras de asimilar este substrato y, últimamente, a la capacidad de síntesis de la proteína de interés (debido a que es la única fuente de carbono y energía suministrada). Asimismo, **la combinación de metanol y glicerol a concentraciones limitantes, durante las primeras etapas del *fed-batch*, favorece la productividad final alcanzada. Con esta estrategia se han incrementado los niveles de ROL recombinante producidos en un factor de 13.6, respecto a los obtenidos en los cultivos iniciales.**

Sin embargo, el seguimiento de la concentración de metanol mediante toma de muestra y análisis subsiguiente por cromatografía de gases, es tan sólo una aproximación para el mantenimiento de la concentración de metanol más o menos constante en el medio extracelular. A pesar de ser una aproximación robusta, que nos ha permitido comprobar todos

los efectos anteriormente citados, las variaciones en las condiciones de cultivo que introduce esta estrategia son importantes, las cuales pueden tener diversas repercusiones sobre el comportamiento del sistema.

Por ejemplo, en los cultivos en *fed-batch* de la cepa ROL multicopia Mut<sup>+</sup> (capítulo 2 de la sección E de Resultados y Discusión, página 55), se ha conseguido una toma de muestras mucho más constante, y por lo tanto, un ajuste más preciso de la concentración de metanol en el caldo de cultivo. Este hecho parece haberse traducido en una mayor capacidad de asimilación del metanol durante fases más tempranas del cultivo en *fed-batch*, respecto a lo observado en experimentos anteriores (capítulo 1 de la sección E de Resultados y Discusión), lo cual se corresponde su vez, con una mayor velocidad de crecimiento en metanol y con una menor producción final. Además, se comprobó que el cultivo en *fed-batch* queda limitado por fuente de nitrógeno al superar los 50 g l<sup>-1</sup> de biomasa. Sin embargo, **los resultados obtenidos a baja densidad celular (erlenmeyer), o bajo unas condiciones operacionales totalmente comparables (cultivos en *batch*) sostienen que existe una mayor capacidad de producción de ROL en las cepas multicopia, respecto a las de una única copia del gen.** Por lo tanto, **los estudios realizados a elevadas densidades celulares (*fed-batch*) no permiten evaluar o discernir los distintos factores que influyen en los niveles de producción de la ROL.** Por ejemplo, ¿se debe la menor productividad de las cepas ROL multicopia Mut<sup>+</sup> a un efecto negativo de la mayor dosis génica (respecto al gen *ROL*), o simplemente, al hecho de haber crecido a una velocidad mucho más elevada, o a una combinación de estos dos factores?. Además, la existencia de un nivel de expresión óptimo para la síntesis y secreción de proteínas es una característica general en los sistemas de expresión eucariotas y es específico para cada proteína.

Existen estudios concretos en los que se han realizado modelos matemáticos que relacionan la velocidad de crecimiento de *P. pastoris* (tanto Mut<sup>s</sup> como Mut<sup>+</sup>) con la velocidad de formación del producto recombinante, para la optimización de la producción final del sistema (d'Anjou *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2000). En estos estudios se describe una velocidad de crecimiento celular crítica que proporciona la mayor productividad del sistema y que, por lo general, es bastante menor a la velocidad de crecimiento máxima en metanol. Precisamente es esta velocidad crítica la que divide y dirige el proceso de inducción a: condiciones de producción óptimas (cuando se asume esta velocidad crítica) o inhibitorias (cuando la velocidad de crecimiento supera la velocidad crítica). Por lo tanto, a pesar de la importancia de mantener unos niveles de metanol que no generen toxicidad en el proceso de cultivo, mantener aquella velocidad de crecimiento óptima para la producción de proteína recombinante (que no para alcanzar un mayor nivel de biomasa) durante la etapa de inducción parece ser uno de los parámetros más importantes a la hora de optimizar el proceso (D'Anjou *et al.*, 2000, 2001).

Los resultados obtenidos en los capítulos 1 y 2 de este trabajo apuntan a la posibilidad de que el parámetro clave a controlar durante la inducción de la expresión de la ROL, bajo el sistema de expresión en  $P_{AOX1}$  en *P. pastoris*, pueda ser la velocidad de crecimiento de la cepa en metanol. Para comprobar esta hipótesis, es necesario e imprescindible tener un sistema de control del cultivo en *fed-batch* robusto, que no introduzca variaciones incontrolables respecto a la concentración del metanol en el caldo de cultivo. Para ello, es necesario disponer de una lectura continua, en línea, de los niveles de metanol en el medio de cultivo, lo cual puede conseguirse a través de la utilización de equipos comerciales desarrollados específicamente para este propósito (*PTI instruments* o *Tracer*, por ejemplo). Como primera aproximación a la comprobación de estas hipótesis, podrían realizarse cultivos en *fed-batch* (bajo las condiciones citadas) manteniendo una velocidad de crecimiento durante el *fed-batch* en metanol de  $0.01 \text{ h}^{-1}$  y  $0.03 \text{ h}^{-1}$ . Es decir, un valor inferior e igual a la velocidad de crecimiento en *fed-batch* a la cual se ha obtenido la máxima productividad en este trabajo ( $0.03 \text{ h}^{-1}$ ), y comprobar de esta forma la influencia de la  $\mu$  sobre los niveles de producción alcanzados.

En la misma línea se encuentran los resultados obtenidos respecto a la expresión de la ROL en cepas  $\text{Mut}^s$  (capítulo 2 de la sección E de Resultados y Discusión), de crecimiento lento en metanol. Se ha comprobado que **el fenotipo celular  $\text{Mut}$  influye sobre la capacidad de producción de la ROL. Los resultados preliminares obtenidos en cepas  $\text{Mut}^s$  indican que la expresión de la ROL, bajo el control del  $P_{AOX1}$ , parece estar favorecida por velocidades de crecimiento en metanol lentas (típicas de estas cepas).** Bajo estas observaciones, se han desarrollado cepas de *P. pastoris*  $\text{Mut}^s$  ROL multicopia, cuyo estudio está en curso en la actualidad.

Por otro lado, se ha iniciado el estudio del posible efecto tóxico de la expresión de la ROL madura en *P. pastoris*, observado con anterioridad en otros sistemas de expresión, como *E. coli* (Beer *et al.*, 1996) o *S. cerevisiae* (Takashashi *et al.*, 1998). **Se ha observado, a baja densidad celular, que la expresión de la ROL tiene un efecto sobre la velocidad de crecimiento de la cepa hospedadora en metanol** (capítulo 1 de la sección E de Resultados y Discusión). Estos resultados también se han observado mediante otras aproximaciones, como por ejemplo, **el descenso de la velocidad de crecimiento en metanol de las cepas ROL multicopia  $\text{Mut}^+$ , bajo condiciones de cultivo en erlenmeyer y en *batch***, en los que, además, los niveles de actividad lipolítica detectados han sido superiores a los de la cepa de una única copia del gen *ROL* (capítulo 2 de la sección E de Resultados y Discusión).

En la misma línea se encuentran los resultados obtenidos en la expresión constitutiva de la ROL (bajo el control del  $P_{GAP}$ ), la cual ha sido prácticamente indetectable, tanto en cultivos en erlenmeyer como a mayor escala (capítulo 3 de la sección E de Resultados y Discusión).

Una posible aproximación, para concluir sobre el supuesto efecto negativo de la expresión de la ROL madura sobre *P. pastoris* podría ser la construcción de una cepa, isogénica a la X-33/ROL, con el centro activo de la ROL modificado, de forma que la proteína no fuera activa. **En cualquier caso, la expresión de la ROL de forma constitutiva en *P. pastoris*, bajo el  $P_{GAP}$ , no ha resultado ser una sistema de expresión alternativo al  $P_{AOX1}$ .**

Paralelamente, también se ha abierto una línea de investigación para evitar los inconvenientes asociados al uso del metanol a lo largo del proceso de producción (control de su concentración, volatilidad, inflamable, etc), manteniendo una de las principales ventajas del sistema  $P_{AOX1}$ , la capacidad de ser inducido. Para ello, se seleccionó el promotor del gen *FLD1* de *P. pastoris*,  $P_{FLD1}$ , inducible por fuente de nitrógeno (capítulo 3 de la sección E de Resultados y Discusión). Así, **se ha llevado a cabo la construcción de un vector de expresión que permite la expresión de la ROL bajo un sistema de inducción por fuente de nitrógeno.** Se ha podido comprobar que **los niveles de lipasa ROL obtenidos, bajo el control del  $P_{FLD1}$ , son máximos en presencia de la combinación de metanol y metilamina. Sin embargo, los niveles de expresión alcanzados en los cultivos con metilamina como fuente de nitrógeno durante la fase de inducción y sorbitol como fuente de carbono, indican que ésta es una estrategia interesante y posiblemente una buena alternativa para la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*.** No obstante, esta alternativa presenta la dificultad asociada de que no se han descrito estrategias de control a elevada densidad celular para el cultivo bajo estos substratos.

Por último, **se ha desarrollado un proceso de recuperación de la lipasa desde el caldo de cultivo hasta la obtención de un extracto de liofilizado ROL**, con un rendimiento de recuperación de la actividad lipolítica del 90%. Además, **se ha realizado la purificación parcial de la ROL mediante un proceso de cromatografía de intercambio catiónico que permite la obtención de la enzima recombinante (con un rendimiento del 60%) para aplicaciones en reacciones de química fina.**

Además, **se ha diseñado un proceso de purificación de la ROL recombinante con un grado de pureza adecuado para la obtención de anticuerpos específicos contra ésta.** La disponibilidad de estos anticuerpos puede contribuir ampliamente a la mejora del estudio global de la producción de la ROL en *P. pastoris*. Por ejemplo, la disponibilidad de los anticuerpos permitiría analizar la expresión intracelular de la ROL a lo largo de la etapa de inducción, tanto en cepas con una única copia del gen *ROL* como para aquellas multicopia, tanto en cepas  $Mut^+$ , como en las cepas  $Mut^s$ . La sobre-expresión de proteínas recombinantes podría haber originado la acumulación del producto en el interior celular, obteniéndose tan sólo una pequeña fracción extracelular. El análisis, mediante *western-blot*, de los niveles de ROL intracelulares proporcionaría una información muy útil para el seguimiento de la optimización del proceso de producción, el cual podría beneficiarse potenciando la secreción del sistema. En este ámbito,

también se han abierto recientemente diversas líneas de investigación en *P. pastoris*, potenciando la secreción de proteínas recombinantes. Una de estas vías es por ejemplo, la obtención de cepas modificadas respecto a la actividad o el nivel de expresión de determinadas enzimas celulares contenidas en el retículo endoplasmático y que participan en el correcto procesamiento y secreción de las proteínas, como la disulfuro isomerasa, o relacionadas con el aparato de Golgi, como el producto del gen *PMR1* que codifica para una bomba de iones  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (Warsame *et al*, 2001, Wei *et al.*, 2000). Algunos de estos ejemplos proporcionarían una nueva línea interesante a estudiar para la optimización del proceso a través de herramientas moleculares.



- Abiodun a., Ogunjimi J.M.C., Gooding C.M., Recinos A., and P.V. Choudary. 1999. High-level secretory expression of immunological active intact antibody from the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*. **21**: 561-567.
- Barr K.A., Hopkins S.A., and K. Sreekrishna. 1992. Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharm Eng*. **12**:48-51.
- Ben Salah A., Fendri K. et Gargoury Y. 1994. La lipase de *Rhizopus oryzae*: production, purification et caractéristiques biochimiques. *Revue Francaise des CORPS GRAS*. 5/6: 133-137.
- Ben-Salah A., Sayari A., Verger R. and Y. Gargouri. 2001. Kinetic studies of *Rhizopus oryzae* lipase using monomolecular film technique. *Biochimie*. Jun; 83 (6):463-9.
- Boze H., Laborde C., Chemardin P., Fabien R., Venturin C., Combarous Y. And G. Moulin. 2001. High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*. **36**: 907-913.
- Brierly R.A., Bussineau C., Kosson R., Melton A. and R.S. Siegel. 1990. Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. *Ann NY Acad Sci*. **589**: 350-362.
- Brocca S., Schmidt-dannert C., Lotti M., Alberghina L. and R.D. Schmid. 1998. Design, total synthesis and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Science*. **7** : 1415-1422.
- Catoni E., Schmidt-Dannert C., Brocca S., and R.D. Schmid. 1997. Overexpression of lipase A and B of *Geotrichum candidum* in *Pichia pastoris*: High level production and some properties of functional expressed lipase B. *Biotechniques*. **11**: 689-695.
- Lin Cereghino G.P.L, Cereghino J.L., Sunga A.J., Johnson M.A., Lim M., Gleeson M. A. G. and J.M. Cregg. 2001. New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene*. **263**:159-169.
- Lin Cereghino J. and J.M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*. Jan;24(1):45-66..
- Clare J.J., Rayment F.B., Ballantine S.P., Sreekrishna K., and A. Romanos. 1991. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology*. **9**: 455-460.

## G. REFERENCIAS

---

- Clare J.J., Romanos M.A., Rayment F.B., Rowedder J.E., Smith M.A., Payne M., Sreerkrishna K., and C.A Henwood. 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high.-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*. **105**: 205-212.
- Cregg J.M., and K.R. Madden. 1988. Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for production of foreign proteins. *Dev Ind Microbiol*. **29**: 33-41.
- Cregg J.M., and K.R.Madden. 1989. Use of site-specific recombination to generate selectable markers. *Mol. Gen. Genet*. **219**: 320-323.
- Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y., and K.R. madden. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol*. **5**: 3376-3385.
- Cregg J.M., Tschopp J.F., Stillman C., Siegel R., Akong M., Craig W.S., Buckholz R.G., Madden K.R., Kellaris P.A., davis G.R., Smiley B.L., Cruze J., Torregossa R., Veliçelebi G., and G.P.Thill. 1987.High-level expression and efficient assembly of the Hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*.*Bio/Technology*. **5**: 479-48.
- Cregg J.M., Vedvick T.S., and W.C. Rasehke. 1993. Recent advantatges in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **II**:905-910.
- Chen Y., Cino J., hart G., Freedman D., White C., and E.A.Komives. 1997. High protein expression in fermentation of recombinant *Pichia pastoris* by a fed-batch process. *Process Biochemistry*. **32**(2): 107-11.
- Chen Y., Jin M., Egborge T., Coppola G., andre J., and D.H. Calhoun. 2000. Expression and characterisation of glycosilated and catalytically active recombinat human  $\alpha$ -galactosidase A produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. **20** : 472-484.
- Chirovolu V., Cregg J.M., and M.M.Meagher. 1997. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatchs fermentations. *Enzyme Microb. Technol*. **21**: 277-283.
- D'Anjou M.C., and A.J. Daugulis. 2001. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol Bioengineering*. **72** (1). January 5:1-11.



- Digan M.E., Lair S.V, Brierley R.A., Siegel R.S., Williams M.E., Ellis S.B., Kellaris P.A., Provow S.A., Craig W.S., Velicelebi G., Harpold M., and G.P. Thill. 1989. Continuous production of a lysozyme via secretion from the yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*. **7**:160-164.
  
- Döring F., Theis S. and D. Hannelore. 1997. Expression and functional characterization of the mammalian intestinal peptide transporter PepT1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **232** : 656-662.
  
- Ecamilla-Treviño L.L., Vilader-Salvadó J.M., Barrera-Saldaña H.A., and M. Guerrero-Olazán. 2000. Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*. **22**: 109-114.
  
- Eggeling L. and H. Sahm. 1980. Regulation of alcohol oxidase synthesis in *Hansenula polymorpha*: oversynthesis during growth on mixed substrates and induction by methanol. *Arch Microbiol. Sep*, 127 (**2**): 119-124.
  
- Egli T. 1991. On multiple-nutrient-limited growth of microorganisms, with special reference to dual limitation by carbon and nitrogen substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Oct-Nov; 60(**3-4**):225-34.
  
- Egli T. and O. Käppeli. 1980. Simultaneous utilisation of glucose and methanol in chemostat cultures by *H. polymorpha* and *Kloeckera* sp. 3<sup>rd</sup> International symposium on microbial growth on C1-compounds,
  
- Egli T. Bosshard C. and G. Hamer. 1986. Simultaneous utilization of methanol-glucose mixtures by *Hansenula polymorpha* in chemostat: influence of dilution rate and mixture composition on utilization pattern. *Biotechnology and Bioengineering*. **28**: 1735-1741.
  
- Egli T., Käppeli O. and A. Fiechter. 1982. Mixed substrate growth of methylotrophic yeasts in chemostat culture: influence of dilution rate on the utilisation of a mixture of glucose and methanol. *Arch. Microbiol*. **131**: 8-13.
  
- Egli T., Lendenman U., and M. Snozzi. 1993. Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources. *Antonie Van Leeuwenhoek*.;63 (**3-4**):289-98.
  
- Ferrer P., Valero C., and C. Solà. 2000. Production of native and tailor-made enzymes for fine chemicals production. In: Kokotos G., Constantinou-Kokotou V. (Eds). *Lipases and Lipids: Structure, function and biotechnological applications*. Crete University Press, Heraklion. 399-411.

## G. REFERENCIAS

---

- Gatignol A., Durand H. and G. Tiraby. 1988. Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. FEBS Lett. Mar 28;230(1-2):171-5.
- Gellissen G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Appl. Microbiol Biotechnol. **54**:741-750.
- Goodman J.M. 1985. Dihydroxyacetone synthase is an abundant constituent of the methanol-induced peroxisome of *Candida boidinii*. J Biol Chem. Jun 10; 260(11):7108-13.
- Hazeu W. and R.A. Donker.
- Higgins D.R., and J.M. Cregg. 1998. *Pichia* protocols. Methods in Molecular Biology. **103**. Humana Press.
- Hiol A., Jonzo M.D., Rugani N., Druet D., Sarda L. and L.C. Comeau. 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit.
- Hochstrasser U., Lücher M., de Virgilio C., Boller T., and A. Wiemken. 1998. Expression of a functional barley sucrose-fructan 6-frucosyltransferase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEBS Letters. **440**: 356-360.
- Holmquist M., Teisser D.C. and Cygler M. 1997. High level production of recombinant *Geotrichum candidum* lipases in yeast *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification. **11**: 35-40.
- Jones G.J. and E. Bellion. 1991. Methanol oxidation and assimilation in *Hansenula polymorpha*. An analysis by <sup>13</sup>C n.m.r. in vivo. Biochemical Journal. **280**: 475-481.
- Katakura Y., Zhang W., Zhuang G., Omasa T., Kishimoto M., Goto Y., and K. Suga. 1998. Effect of methanol concentration on the production of human  $\beta$ 2-glycoprotein I domain V by recombinant *Pichia pastoris*. A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. J. Ferm. Bioeng. **86**: 482-487.
- Kobayashi K., Kuwae S., Ohya T., Ohda T., Ohyama M. and K. Tomomitsu. 2000. High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. Journal of Bioscience and Bioengineering. 90 (3): 280-288.

- Koutz P., Davis G.R., Sillman C., Barringer K., Cregg J.M., and G. Thill. 1989. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*. **5**: 167-177.
- Lee J.D., and K. Komagata. 1980. Taxonomy study of methanol assimilating yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **26**:133-158.
- Li Z., Xiong F., Lin Q., d'Anjou M., Dauglis A.J., Yang D.S.C., and C.L. Hew. 2001. Low-Temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. **21** : 438-445.
- Loewen M.C., Liu X., and A.J. Daugulis. 1997. Biosynthetic production of type II fish antiprotein: fermentation by *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **48** :480-486.
- Mayer A.F., Hellmuth K., Schlieker H., López-Ulibarri R., Oertel S., Dahlems U., Strasser A.W.M., and A.P.G.M. Van Loon. 1999. An expression system matures: a highly efficient and cost effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology and Bioengineering*. **63**:373-381.
- McGrew J.T., Leiske D., Dell B., Klink R., Krasts D., Wee S., Abbot N., Armitage R., and K. Harrington. 1997. Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants. *Gene*. **187**: 193-200.
- Minning S., Schmidt-dannert C., and R.D. Schmid. 1998. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *J. Biotechnology*. **66**: 147-156.
- Moore A.L., and P.R. Rich. 1980. *Trends in Biochemical Sciences*. **5**: 284.
- Murdanoto A.P., Sakei Y., Konishi T., Yasuda F., Tani Y., and N. Kato. 1997. Purification and properties of methyl formate synthase, a mitochondrial alcohol dehydrogenase, participating in formaldehyde oxidation in methylotrophic yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. **63** (5): 1715-1720.
- Ogata K., Nishikawa H., and M. Ohsugi. 1969. A yeast capable of utilizing methanol. *Agric. Biol. Chem.* **33**:159-1520.
- Okumura S.A., Yamanoi R., Tsubugawa and T. Nakae. 1970. UK Patent Specif 1, 210, 770.

## G. REFERENCIAS

---

- Patel N.R., Hou C.T., Iaskin A.I., and P. Derelanko. 1981. Microbial production of methylketones: properties of yeast second alcohol dehydrogenase. *J. Appl Biochem.* **3**:218-226.
- Penninckx M. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. 2000. *Enzyme and Microbial Technology.* **26**: 737-742.
- Piskur J., Petersen R.F., Groth C., Marinoni G., Nielsen M. L., Liu W., Gojkovic Z., and J. Hvidtfeldt. 1998. Modern yeast genomes have evolved using different molecular mechanisms. *Yeast genetics and Molecular Biology Congress.* Maryland.
- Potter K.J., Zhang W., Smith L.A., and M.M. Meagher. 2000. Production and purification of the heavy chain fragment C of Botulinum neurotoxin, serotype A, expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification.* **19** : 393-402.
- Rodríguez J. E., Sánchez K., Roca H., and J.M. Delgado. 1997. Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase. *Biotechniques.* **11** : 461-466.
- Sahasrabudhe A.V., Solapure S.M., Khurana R., Suryanarayan V., Ravishankar S., deSousa S.M. and G. Das. 1998. Production of recombinant lipase and its variant in *Pichia pastoris* . *Protein Expression and Purification.* **14** :425-433.
- Sakai Y., Murdanoto A. P., Konishi T., Iwamatsu A. and N. Kato.1997. Regulation of the formate dehydrogenase gene, FDH1, in the methylotrophic yeast *Candida boidinii* and growth characteristics of an FDH1-disrupted strain on methanol, methylamine, and choline. *Journal of Bacteriology.* 179 (**14**): 4480-4485.
- Sakai Y., Murdanoto A.P., Sembiring L., Tani Y., and N. Kato. 1995. A novel formaldehyde oxidation pathway in methylotrophic yeasts: methylformate as a possible intermediate. *FEMS Microbiol Lett.* 127 (**3**): 229-234.
- Seoighe C., and K. H. Wolfe. 1998. Genome duplication, gene order, and chromosomal evolution in yeast species. *Yeast genetics and Molecular Biology Congress.* Maryland.
- Sheffield. UK. Müller R.H., Sysoev O.V., and W. Babel. 1986. Use of formate gradients for improving biomass yield of *Pichia pinus* growing continuously on methanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25** : 238-244.

- Shigan S., Greitje S., Thhomas W.J., and J.M. Cregg. 1998. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. **216**: 93-102.
- Sreekrishna K., Brankamp R.G., Kropp K.E., Blankenship D.T., Tsay J.T., Smith P.L., Wierchke J.D., Subramaniam A., and L.A. Birkenberger. 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. **190**: 55-62.
- Sreekrishna K., Brankamp R.G., kropp K.E., Blankenship D.T., Tsay J. M., Smith P.L., and J.D., Wierschke. 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. **190** : 55-62.
- Sreekrishna K., nelles L., Potenz R., Cruze J., Mazzaferro P., Fish W., Fuke M., Holden K., Phelps D., Wood P., and K.Parker. 1989. High-level expression, purification and characterisation of recombinant human Tumor Necrosis Factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*. **28**:4117-4125.
- Straton J., Chiruvolu V. and M. Meagher. 1998. High cell density fermentation. In: Higgins, D.R. and J.M. Cregg. *Pichia Protocols*. *Methods Mol Biology*, **103** : 107-120. Humana Press.
- Swartz J. and C.L. Cooney. 1981. Methanol inhibition in continuous culture of *Hansenula polymorpha*. *Applied and Enviromental Microbiology*. May, 1206-1213.
- Takahashi S., Ueda M., Harayuki A., Beer H.D., Bornscheuer U.T., Schid R.D., and A. Tanaka. Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. 1998. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86. 2: 164-168.
- Tani Y, Kato N. and H. Yamada. 1978. Utilization of methanol by yeasts. *Adv Appl Microbiol*. **24**:165-86
- Ohtani W., Nawa Y., takeshima K., Kamuro H., Kobayashi K., and T. Ohmura. 1998. Physicochemical and inmunochemical properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris*. *Anal. Biochem*. 256 : 56-62.
- Tani Y., Yamada K., sakai Y., and V. Vongsuvalert. 1990. Biocatalytic and fermentative production of useful chemicals by processes using methylotrophs. *FEMS Microbiology Reviews*. **87**: 285-290.

## G. REFERENCIAS

---

- Tani Y., Yonehara Y., Sakai Y., and B.D. Yoon. 1987. Application of some methylotrophic functions to synthesis of useful chemicals in microbial growth of C<sub>1</sub> compounds. 282-288.
- Thill G.P., Davis G.R., Stillman C., Holtz G., Brierley r., Engel M., Buckholtz R., Kinney J., Provow S., Vedvick T., and R.S. Siegel. 1990. Positive and negative effects of multicopy expression integrated vectors on Protein expression in *Pichia pastoris* in "Proceedings of the 6<sup>th</sup> international symposium on genetics of microorganisms". **2**:477-490. Societe Francaise de Muicrobiologie, Paris.
- Thomson C.A., Delaquis P.J., and G. Mazza. 1999. Detection and measurement of microbial lipase activity – a review. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. **39**: 165-187.
- Thorpe E.D., d'Anjou M. C. and A. J Daugulis. 1999. Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. Biotechnology Letters. **21**: 669-672.
- Tschopp J.F., Sverlow G., Kosson R., Craig W., and L. Grinna. 1985. High-level secretion of glycosilated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. Bio/Technology. **5**: 1305-1308.
- Tschopp J.F., Brust P.F., cregg J.M., Stillman C.A., and T.R. Gingeras. 1987. Expression of the *lacZ* gene from two methanol regulated promoters in *Pichia pastoris*. Nucleic Acids Res. **15**: 3859-3876.
- Unilever. 1987. Process of preparing a catalasa-free oxidase and a catalasa-free oxidase containing yeast, and the use thereof. Europ. Pat. Appl. 242007.
- Van-Dijken J.P., Oostra-Demkes G.J., Otto R. and Harder W. 1976. S-formylgluthathione: the substrate for formate dehydrogenase in methanol-utilizing yeasts. Arch Microbiol. Dec 1;111(1-2):77-83.
- Van Dijken J.P., Otto R., and W. Harder. 1976. Growth of *Hansenula polymorpha* in a methanol-limited chemostat. Arch. Microbiol **III**: 137-144.
- Vassilea A., Chugh D.A., Swaminathan S., and N. Khanna. 2001. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification. **21**: 71-80.
- Sánchez A., Ferrer P., Serrano A., Pernas M., Valero F., Solà C., Rúa M.L., Casas C., and C. Solà. 1999. Characterization of the lipase and esterase multiple forms in an enzyme

- preparation from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. 1999. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 214-223.
- Rúa M.L., Díaz Mauriño T., Fernández V.M., Otero C. and A. Ballesteros. 1993. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochemical and Biophysical Acta*. 1078: 181-189.
  - Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 1970. *Nature*. 227: 680-685.
  - 
  - Vassileva A., Chugh D.A, Swaminathan S. and N. Khanna. 2001. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. **21**: 71-80.
  - Veenhuis M., Van Dijken J.P. and W. Harder. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv. Microb. Physiol*. **24**: 1-78.
  - Verachtert H., and R. De Mot. *Yeast Biotechnology & Biocatalysis*. 1990. Marcel Dekker Inc., Bioprocess Technology series Editor. New York.
  - Wegner G.H. 1983. Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities. US Patent 4414329.
  - Wegner, G.H. 1990. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*. **87**: 279-284.
  - Yang Y. and M. E. Loewe. 1998. Human pancreatic triglyceride lipase expressed in yeast cells: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*. **13**: 36-40.
  - Zhang W., Bevins M.A., Plantz B.A., Smith L.A. and M. M. Meagher. 2000. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of Botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnology and Bioengineering*. 70 (1): 1-8.
  - Waterham H.R., Digan M. E., Koutz P.J., Lair S.V., and J.M. Cregg. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*. **186**: 37-44.

## G. REFERENCIAS

---

- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248.
- Tani Y., Kato N. and H. Yamada. 1978. *Advances in applied Microbiology.* **24**: 165.
- Harder W., Egli T., Bystrikh L.V. and Y.A. Trotsenko. 1987. In: *Microbial growth on C1-compounds.* H.W. van Versseveld and J.A. Duine, Eds. 139-149.
- Sánchez A., Ferrer P., Serrano A., Valero F., Solà C., Pernas M., Rúa M.L., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M., de la Casa R. M., Sinisterra J.V., and J.M. Sánchez-Montero. 1999. A controlled fed-batch cultivation for the production of new crude lipases *Candida rugosa* with improved properties in fine chemistry. *Journal of Biotechnology.* **69**: 169-182.
- Beer H.D., Wohlfahrt G., Schmid R.D. and E.G. McCarthy. 1996. The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence. *Biochemical Journal.* **319**: 351-359.
- Beer H.D., McCarthy J.E.G., Bornscheuer U.T. and R. Schmid. 1998. Cloning, expression, characterisation and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. *Biochimica and Biophysica Acta.* **1399**: 173-180.
- d'Anjou M.C., and A.J. Daugulis. 2000. Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. *Biotechnology Letters.* **22**: 341-346.
- d'Anjou M.C., and A.J. Daugulis. 2000. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology and Bioengineering.* **72**. 1: 1-11.
- Loewen M.C., Liu X., Davies P.L. and A.J. Daugulis. 1997. Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **48**: 480-486.
- Müller R.H., Sysoev O.V., and W. Babel. 1986. Use of formate gradients for improving biomass yield of *Pichia pinus* growing continuously on methanol. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **25**: 238-244.
- Brierly R.A., Bussineau C., Kosson R., Melton a., and R.S. Siegel. 1990. Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. *Ann NY Acad Sci.* **589**: 350-362.



- Ohi H., Miura M., Hiramatsu R., and T Ohumura. 1994. The positive and negative cis-acting elements for methanol regulation in the *Pichia pastoris* AOX2 gene. *Molecular Gen Genet.* **243**, 3: 489-499.
  
- Guan C., Li P., Riggs P.D., and H. Inouye. 1987. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene.* **67**: 21-30.
  
- Verger R. 1997. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Tibtech.* **15**: 32-38.
  
- Ghosh P.K., Saxena R.K., Gupta R., Yadav R.P., and S. Davidson S. 1996. Microbial lipases: Production and applications. *Sci Prog.* **79**: 119-157.
  
- Jaeger K.E. and M.Y.Reetz. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Tibtech.* **16**, 9: 396-403.
  
- Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam O., Krieger N., and V.T. Soccol. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* **29**, 2: 119-131.
  
- Tschopp J.F., Sverlow G., Kosson R., Craig W., and L. Grinna. 1987. High Level secretion of glycosilated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology.* 5: 1305-1308.
  
- Schmidt-Dannert C. 1999. Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorg Med Chem.* **7**,10, 2123-2130.
  
- Tani Y., Yamada K., Sakai Y., and V. Vongsuvanlert. Biocatalytic and fermentative production of useful chemicals by processes using methylotrophs. 1990. *FEMS Microbiology Review.* 87: 285-290.
  
- Warsame A., vad R., Kristensen T. and T.B. Oyen. 2001. Characterization of a gene encoding a *Pichia pastoris* protein isomerase. *Biochemical and Biophysical Ressearch Community.* 281. 5: 1176-1182.
  
- Wei Y., Chen J., Rosas G.,Tompkins D. A., Holt P. A., and R. Rao. 2000. Phenotypic screening of mutations in Pmr1, the yeast secretory pathway  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$ -ATPase, reveals residues critical for ion selectivity and transport. *The Journal of Biological Chemistry.* 275. 31, 23927-23932.