

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE UNA LIPASA DE *Carica papaya* BAJO EL PROMOTOR P_{AOX1} EN LA LEVADURA *Pichia pastoris*

Ana Reyes¹, Gerardo Altamirano¹, Ivanna Rivera¹, Francisco Valero², y Georgina Sandoval¹.

¹CIATEJ. Av. Normalistas 800, Guadalajara, Jal., 44270. ²UAB, Bellaterra, Barcelona, España.

anreyes_al@ciatej.edu.mx; gsandoval@ciatej.mx

Palabras clave: Expresión heteróloga, *P. pastoris*, Biorreactor, Lipasa, Papaya.

Introducción.

La falta de disponibilidad de enzimas como biocatalizadores para la generación de biocombustibles, promueve la búsqueda de estrategias de obtención¹. En este sentido, el empleo de factorías de alto rendimiento para la expresión de proteínas recombinantes y el uso de vectores inducibles las vuelve una fuerte herramienta biotecnológica. Sin embargo, limitantes como concentraciones de inductor, tipos de medios, velocidades de crecimiento de los microorganismos y escala de producción son parámetros de estudio². Por lo anterior, el presente trabajo, tiene como objetivo evaluar dos escalas de producción de una lipasa de *C. papaya* mediante la construcción pPICZαB-Lip expresada en *P. pastoris* para la identificación de condiciones que favorecen mayor rendimiento.

Metodología.

Fermentación a dos escalas: nivel matraz y biorreactor. Para el primer caso, en un matraz bafleado de 250 mL, se inoculó 25 mL de medio YPG (10 g/L extracto levadura, 20 g/L Peptona y 40 g/L Glicerol). Las condiciones del precultivo y cultivo siguieron el mismo esquema descrito por Rivera *et al.*, 2017³. A las 24 h, se realizó alimentación con glicerol hasta alcanzar una concentración final de 20 g/L. A partir de las 48 h, se procedió a inducir la producción de la lipasa agregando metanol 3 g/L. En biorreactor de 3 L, el volumen de medio fue de 2 L. La fermentación se programó a una aireación constante de 1 vvm y agitación de 800 rpm. El tipo de medio, preparación de preinóculo, alimentación e inducción fue siguiendo el esquema empleado en matraz. Antes de las 24 h fue necesaria la adición de antiespumante. Para ambas fermentaciones, se colectaron muestras a diferentes tiempos con la finalidad de evaluar los parámetros de actividad lipasa (hidrólisis de pNPB)⁴, proteínas (mg/mL) y biomasa por peso seco (g/L).

Resultados.

De acuerdo a los resultados generados, se confirma que el sistema *P. pastoris* es una alternativa como factoría de obtención de lipasas. Desde el punto de vista de producción, el mayor título de actividad lipasa (0.17 U/mL) se obtuvo en biorreactor a las 72 h, mientras que en matraz (0.15 U/mL) a las 48 h (**Fig. 1A**). La cinética de proteínas determinada en biorreactor coincide con los tiempos de actividad lipasa (**Fig. 1B**). En ambas fermentaciones, en la primera etapa el medio YPG, favoreció el crecimiento de la levadura (**Fig. 1C**), pero fue en biorreactor donde se obtuvo mayor concentración de biomasa en menor tiempo (35 g/L en 38 h). El comportamiento identificado en biorreactor ha sido observado en fermentaciones realizadas donde producen lipasa de *Rhizopus oryzae* en *P. pastoris*⁵. La segunda etapa de transición de fuente de C (glicerol a metanol) ocurrió a partir de las 48 h. Este procedimiento y tiempo, coincide con el aumento

de la actividad lipasa. Durante la etapa de inducción, sobre la cual se adicionó metanol, se mejoró el aumento de actividad lipasa en biorreactor.

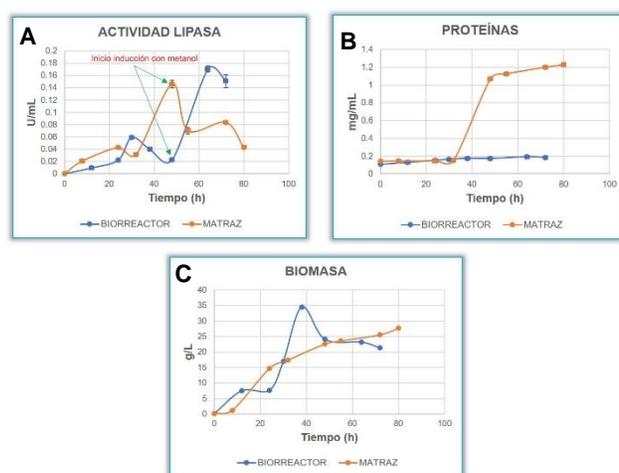


Fig. 1. Producción de lipasa en matraz y biorreactor. A) cuantificación de la actividad enzimática. B) Determinación de proteínas y C) cinética de crecimiento celular.

Conclusiones.

Las condiciones de fermentación en biorreactor favorecieron notoriamente la mayor producción de lipasa. Sin embargo, se requiere de continuar con la optimización de las condiciones a fin de reducir el tiempo de producción y aumentar los títulos de actividad lipasa.

Agradecimientos.

Al Clúster Biodiésel Avanzado (proyecto CB-237737) por el financiamiento de esta investigación.

Bibliografía.

1. Reyes A, Zamarripa A, Iracheta L, Espinosa S, Villareal A. 2015. Agroproduktivität. 8:19-24.
2. Valero F. 2018. Recent Advances in *Pichia pastoris* as Host for Heterologous Expression System for Lipases: A Review. In: Sandoval G (ed). Lipases and Phospholipases. Methods Mol Biol. 1835:205-216
3. Rivera I, Robles M, Mateos-Díaz JC, Gutiérrez-Ortega A, G Sandoval. 2017. Process Biochemistry. 56:109–116.
4. Guieysse D, Sandoval G, Faure L, Nicaud JM, Monsan P, Marty A. 2004. Tetrahedron: Asymmetry. 15:3539-3543.
5. Minning S, Serrano A, Ferrer P, Solá C, Schmid RD, Valero F.. 2001. J Biotechnol. 86(1):59-70.