

## OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA INCREMENTAR LA PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA DE UNA FITASA EN *Pichia pastoris* REGULADA POR EL PROMOTOR *GAP* E IMPACTO EN LA RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL HOSPEDERO

Ana Lucía Herrera-Estala, José Antonio Fuentes-Garibay, Martha Guerrero-Olazarán, José María Viader-Salvadó  
Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología  
San Nicolás de los Garza, N.L., México C.P. 66455. jose.viadersl@uanl.edu.mx

*Palabras clave:* *Pichia pastoris*, promotor *GAP*, método de optimización Simplex

**Introducción.** Generalmente, la inducción del gen heterólogo en *Pichia pastoris*, se realiza con el promotor *AOX1* y metanol. Sin embargo, el riesgo que implica el uso del metanol y la complejidad del control del proceso a nivel industrial ha dado a lugar a buscar promotores alternativos. Uno de ellos es el promotor *GAP* que regula la expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de forma constitutiva. La optimización de las condiciones de cultivo ha demostrado que también influye en la producción de la proteína heteróloga e impacta en la fisiología de la levadura (1).

El objetivo de este trabajo fue optimizar las condiciones de cultivo para incrementar la productividad volumétrica constitutiva de la fitasa FTEII en *P. pastoris* y determinar el impacto del proceso de optimización en la respuesta fisiológica del hospedero.

**Metodología.** Se diseñaron y realizaron 7 experimentos (5 cultivos iniciales, 2 rondas de optimación) empleando la cepa KM71GAHFTEII y el método Simplex con combinaciones de dos niveles cada uno de los cuatro factores a optimizar: concentración inicial de la fuente de carbono y temperatura, pH y velocidad específica de crecimiento en la etapa de lote alimentado con glicerol, con el fin de incrementar la productividad volumétrica extracelular de fitasa. Todos los cultivos se realizaron en un biorreactor de 7 L, en dos etapas: un cultivo en lote empleando glicerol como fuente de carbono, seguido de un cultivo en lote alimentado con glicerol. Además, se determinaron parámetros fisiológicos bioquímicos (velocidad específica de crecimiento,  $\mu$ , rendimiento celular proveniente del glicerol,  $Y_{x/s}$ ; rendimiento de producción extracelular de fitasa/biomasa,  $Y_{p/x}$ ; y el rendimiento de producción extracelular de fitasa proveniente de glicerol,  $Y_{p/s}$ ). También se determinaron los niveles relativos de expresión de los genes *FTEII* y *GAP*, al final de la etapa de lote alimentado por RT-qPCR mediante el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

**Resultados.** En la primera etapa de optimación (cultivos A-E), la productividad volumétrica máxima fue de 309 U/L h. La producción volumétrica extracelular de fitasa fue de 5,687 a 12,747 U/L de cultivo. Las condiciones de cultivo de los dos siguientes experimentos

(cultivo F y G), condujeron a una productividad volumétrica de 328 y 384 U/L h, respectivamente. La producción volumétrica extracelular de fitasa fue de 18,914 a 19,945 U/L de cultivo. El  $Y_{x/s}$  fue desde 0.37 g/g hasta valores entre 0.41 y 0.51 g/g. El  $Y_{p/x}$  inició en 55 U/g, hasta llegar a un valor de 152 U/g. Por último, el  $Y_{p/s}$  fue desde 19 hasta 67 U/g. Durante el proceso de optimación, la concentración inicial de glicerol y el pH en el lote alimentado con glicerol fueron oscilando entre 30-50 g/L y 4-6, respectivamente. Sin embargo, la temperatura y la velocidad específica de crecimiento disminuyeron. Los niveles de expresión del gen *GAP* en el cultivo A fueron mayores que en el cultivo G, sin embargo, los del gen *FTEII* fueron prácticamente constantes. En ambos cultivos, los niveles de expresión del gen *GAP* fueron mayores que los de *FTEII*, a pesar que los dos genes están regulados por el mismo promotor.

**Conclusiones.** Con el proceso de optimación se llegaron a producir 19,945 U/L y 384 U/L h de fitasa, lo cual es 3.5 y 1.9 veces mayor que el cultivo de menor producción y productividad volumétrica extracelular de fitasa. La concentración inicial de glicerol y el pH en la etapa de lote alimentado con glicerol no mostraron un gran impacto en la productividad volumétrica extracelular de fitasa, mientras que la temperatura y la velocidad específica de crecimiento influyeron de forma inversamente proporcional. El proceso de optimación generó un aumento de los tres rendimientos ( $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/x}$ ,  $Y_{p/s}$ ). La disminución de la velocidad específica de crecimiento resultó ser el factor que más influyó en el aumento del  $Y_{p/x}$  y por lo tanto en la eficiencia celular para producir la fitasa recombinante de forma extracelular, por lo que es posible que exista una limitación del proceso de secreción a mayor velocidad específica de crecimiento y no en la transcripción del gen heterólogo.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen el apoyo del PAICYT 2018 (CN595-18) y al proyecto CONACYT-SEP CB-2016-01-286093. ALHE agradece el apoyo del CONACYT por la beca otorgada.

### Bibliografía.

1. Viader-Salvadó JM *et al.* (2013). *Biotechnol. Prog.* 29:1377-1385.

