

## ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FISIOLÓGÍA DE *PICHIA PASTORIS* Y LA PRODUCCIÓN DE UNA LACASA DE *TRAMETES VERSICOLOR* SOBRE CULTIVO SÓLIDO Y EN CULTIVO LÍQUIDO

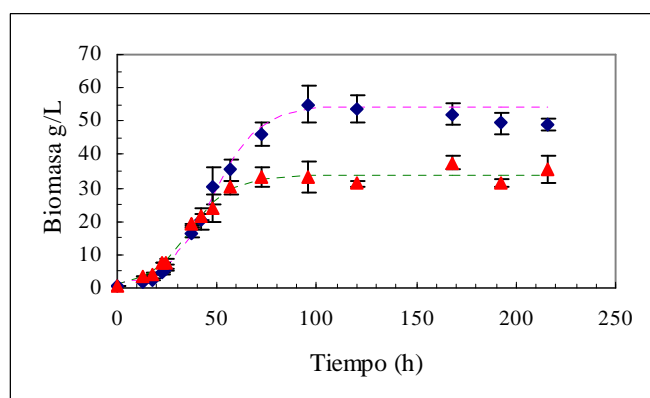
López M<sup>1</sup>, Viader-Salvadó JM<sup>2</sup>, Guerrero-Olazarán M<sup>2</sup>, Favela-Torres E<sup>1</sup>, Fernández-Perrino FJ<sup>1</sup>, Loera O<sup>1</sup>, y Viniegra-González G<sup>1</sup>. 1Departamento de Biotecnología U.A.M. (Iztapalapa). Col. S. Rafael Atlixco, México D.F. C.P. 09340. Tel 58044600 E-mail. [estrobarrío@gmail.com](mailto:estrobarrío@gmail.com) 2. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, N.L.

*Palabras clave:* lacasas, expresión heteróloga, *Pichia pastoris*

**Introducción.** Las lacasas catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos, incluyendo difenoles, polifenoles y fenoles sustituidos<sup>1</sup>. Estas enzimas se pueden producir en forma recombinante empleando *Pichia pastoris* como hospedero, bajo el control del promotor AOX1, inducible con metanol<sup>2</sup>. Tradicionalmente, los cultivos de *P. pastoris* se realizan en medios líquidos. Este estudio se centra en la posibilidad de utilizar el soporte sólido para realizar cultivos de alta densidad celular sin la utilización de oxígeno puro.

El objetivo de este trabajo fue comparar la fisiología de *P. pastoris* y la producción de una lacasa de *Trametes versicolor* recombinante en cultivo líquido (CL) y cultivo sólido (CS).

**Metodología.** Se midió la biomasa (g peso seco/L) generada, así como la actividad de lacasa, bajo distintas condiciones de cultivo en espuma de poliuretano (PUF) y matraz agitado, modificando tres variables: cantidad de glicerol inicial (12, 50 y 100 g/L); cantidad de metanol usado como inductor (0, 7.9 y 31.6 g/L), así como el tiempo en el cual el cultivo permaneció en crecimiento solo con glicerol como fuente de carbono. Este tiempo se incrementó proporcionalmente a la cantidad de glicerol inicial (48, 72 y 192 h, respectivamente).



**Fig. 1.** Cinética de crecimiento de la cepa GS115(55), con 100 g/L de glicerol y en ausencia de metanol. La curva se construyó aplicando el modelo logístico: ▲ (CL), ◆ (CS).

**Resultados y discusión.** El caldo de cultivo se encontró disperso en el PUF en multitud de láminas con grosor < 100 nm (A/V ≈ 200/cm). La variación de la concentración de glicerol entre 12 y 100 g/L, causó grandes diferencias en el valor de biomasa máxima obtenida (Figura 1), tanto en CL (31.9 g/L), como en CS (50.4 g/L). En experimentos análogos se estudió el efecto del soporte de crecimiento sobre el rendimiento de enzima: Yp/x (U/L)/g (Tabla1.)

Tratamiento	[glicerol]	[metanol]	Y p/x
CL/L	100	7.9-31.6	0.14±0.03 <sup>a</sup>
CS/S	100	7.9-31.6	0.07±0.006 <sup>b</sup>
CS/L	100	7.9-31.6	0.15±0.04 <sup>a</sup>

**Tabla1.** Rendimiento de enzima en función del tipo de cultivo. **CL/L:** Biomasa recuperada del matraz en agitación e inoculado en nuevo CL para inducción. **CS/S:** Biomasa recuperada del CS en PUF e inoculado sobre nuevo CS en PUF para inducción. **CS/L:** Biomasa recuperada del soporte sólido e inoculado en CL para inducción. Los valores de Y p/x (U/L)/g con distinta letra mostraron diferencias significativas (p<0.002).

**Conclusiones.** La relación elevada del cociente Área/Volumen del caldo de cultivo disperso en CS, favorece el crecimiento de las levaduras, especialmente si S<sub>0</sub> > 50 g/L, pero presenta barreras al metanol como inductor (CS/S). Estas barreras se resuelven con agitación (CS/L). Por lo tanto, las capas finas de levaduras tienen barreras diferentes para la difusión al oxígeno en comparación con los sustratos solubles en agua, como el metanol. Esto es importante para el diseño de futuros soportes sólidos dedicados al cultivo de las levaduras.

### Agradecimientos.

A CONACYT por el financiamiento de la investigación (N<sup>o</sup> Becario 202365).

### Bibliografía.

- Messerschmidt, A. 1997. Copper metalloenzymes. In comprehensive Biocatalysis, Vol 3. Boca Ratón CRC Press P 1-35.
- Jonsson LJ, M Saloheimo and M Pentilla. 1997. Laccase from the white - rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris*. *Curr Genet* 32: 425-430.