



PRODUCCIÓN EN BIORREACTOR DE UNA FITASA BACTERIANA CON CEPAS RECOMBINANTES DE *PICHIA PASTORIS* Y SU PURIFICACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Miguel Castillo-Galván, José A. Fuentes-Garibay, Martha Guerrero-Olazarán, José M. Viader-Salvadó
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Av. Pedro de Alba s/n, Col. Cd.
Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México, 66450. (81) 83294000 ext. 6439,
jmviader@yahoo.com.mx

Palabras clave: fitasa C, *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis*.

Introducción. Las fitasas catalizan la liberación de fosfato del fitato, un compuesto orgánico que se encuentra en cereales y granos. La falta de fitasas en animales monogástricos ha impulsado la producción de estas enzimas a nivel industrial. La mayoría de las fitasas que se encuentran en el mercado tienen actividad a pH ácido. Recientemente se ha descrito una fitasa de *Bacillus subtilis* (fitasa C) (1) que tiene su máxima actividad a pH neutro, pero sus niveles de producción son muy bajos. La producción de esta enzima en cultivos de *Pichia pastoris* a alta densidad celular podría ser una alternativa para su obtención a gran escala.

En el presente trabajo, se evaluó la producción de la fitasa C recombinante en cultivos de *P. pastoris* a alta densidad celular y una estrategia de purificación del medio de cultivo libre de células.

Metodología. Se empleó una cepa recombinante de *P. pastoris* KM71 Mut^s que contiene el gen de la fitasa C de *B. subtilis* fusionado a la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*. Se realizaron cinco cultivos en biorreactor empleando tres etapas. La primera etapa se llevó a cabo a 30°C y pH 5 en 2 L de medio de sales basales con 50 g/L de glicerol, hasta agotar la fuente de carbono (19 h). La segunda etapa se inició después de una ausencia de alimentación de 45 min y se realizó hasta alcanzar la densidad celular deseada para el inicio de la etapa de inducción (9-17 h), alimentando glicerol al 50% a un flujo de adición ≤ 1 mL/min. La última etapa se inició después de 45 min de ausencia de alimentación y un ajuste de pH a 6, alimentando con metanol constante por 70-130 h. La concentración de metanol en el medio de cultivo se mantuvo constante con ayuda de un controlador ON/OFF de metanol. Con los cinco cultivos en biorreactor, se evaluó el efecto de la concentración de metanol (0.5, 1.0 y 2.0 g/L) en el medio de cultivo, la temperatura en la etapa de inducción (20 y 30°C) y la densidad celular al inicio de la etapa de inducción (250 y 350 g/L). Posteriormente, se evaluó una estrategia secuencial de purificación de la fitasa C del medio de cultivo libre de células mediante microfiltración, concentración y diafiltración por ultrafiltración, además de una etapa por cromatografía de intercambio aniónico.

Resultados y discusión. Los tres cultivos realizados variando sólo la concentración de metanol en el medio de

cultivo mostraron un comportamiento similar en la actividad de fitasa a lo largo del tiempo de inducción, aumentando hasta 4,500 U/L en el mejor caso, y disminuyendo en las últimas 12-18 h. El cultivo realizado a 1.0 g/L de metanol mostró una productividad volumétrica de 63 U/L·h, mientras que en los otros dos cultivos fue de 54 U/L·h. En el cultivo a una densidad celular de 350 g/L se obtuvo una actividad de fitasa máxima de 4,800 U/L y una productividad volumétrica de 107 U/L·h, valores 1.07 y 1.70 veces mayores que en el cultivo a 250 g/L. En el cultivo a 20°C durante la etapa de inducción, se obtuvo una actividad de fitasa máxima de 12,500 U/L y una productividad volumétrica de 155 U/L·h, 2.81 y 1.45 veces mayores que en el cultivo a 30°C. Las condiciones de cultivo en la etapa de inducción de 20°C, 350 g/L de densidad celular y 1 g/L de metanol en el medio de cultivo fueron las que presentaron mayor productividad volumétrica y por ende una mayor cantidad de fitasa C recombinante (1 g/L) en menor tiempo. En la etapa de purificación por ultrafiltración, se obtuvo una recuperación del 97.4%, con un factor de purificación y concentración de 4.2 y 20.8, respectivamente. En la etapa cromatográfica, se recuperaron dos fracciones con actividad de fitasa. La primera fracción presentó una recuperación del 14.5% con un factor de purificación de 5.5, mientras que la segunda presentó una recuperación del 9.2% y un factor de purificación del 1.4. Las dos fracciones con actividad de fitasa mostraron el mismo peso molecular por SDS-PAGE (44-52 kDa), mayor que el peso molecular teórico (39 kDa), por lo que podrían ser dos diferentes formas glicosiladas de la fitasa C.

Conclusiones. *P. pastoris* produce y secreta eficientemente la fitasa C al medio de cultivo, generando 100 veces más fitasa C que la reportada para la cepa nativa (1). Por lo tanto, este bioproceso representa una alternativa para la producción de esta fitasa.

Agradecimientos. Agradecemos el apoyo por parte de CONACYT-SAGARPA (2003-02-141) y PAICYT (CN1555-07). MCG agradece la beca del CONACYT.

Bibliografía.

1. Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen V, Kalkkinen N y Apajalahti J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(6): 2079-2085.