



EFFECTO DEL GEN HETERÓLOGO Y LA TEMPERATURA DE LA ETAPA DE INDUCCIÓN EN LA FISIOLÓGÍA DE LA LEVADURA *PICHIA PASTORIS*

José María Viader-Salvadó, Miguel Ángel Gruintal-Santos, José Antonio Fuentes-Garibay, Jonathan E. Huerta-Álvarez, Karla Beatriz Fernández-Cano, María Magdalena Iracheta-Cárdenas, Martha Guerrero-Olazarán
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455. jose.viadersl@uanl.edu.mx

Palabras clave: fisiología de Pichia pastoris, temperatura cultivo, gen heterólogo

Introducción. Generalmente la expresión de genes heterólogos en la levadura *Pichia pastoris* se realiza mediante el control del promotor *AOX1*, el cual se induce con metanol. Sin embargo, la expresión del gen heterólogo y el cambio de condiciones ambientales de la etapa de generación de biomasa a la de inducción (fuente de carbono, pH, y temperatura) generan un estrés celular que impacta en la fisiología de la levadura (1).

En el presente trabajo, se evaluó el efecto del gen heterólogo y la temperatura de la etapa de inducción en la fisiología de la levadura *P. pastoris*.

Metodología. Se emplearon cepas recombinantes de *P. pastoris* Mut^s KM71FTEII y KM71HGH que producen y secretan al medio de cultivo una fitasa (FTEII) o bien la hormona del crecimiento humano (HGH). Como cepa control sin gen heterólogo, se empleó la cepa KM71pPIC9. Se realizaron un total de seis cultivos (tres cepas a dos temperaturas de inducción) en un biorreactor de 7 L, empleando tres etapas: lote y lote alimentado con glicerol, y lote alimentado con metanol. La última etapa se realizó a dos temperaturas (30 y 24°C) por 68 h. La concentración de metanol en el medio de cultivo se mantuvo constante a un valor de 1.5 g/L y el valor del oxígeno disuelto por arriba del 20% de saturación.

Resultados. Los cultivos a 24°C mostraron un tiempo de acondicionamiento a la etapa de inducción de 21-23 h para las cepas KM71pPIC9 y KM71FTEII, y de 12 h para la cepa KM71HGH, lo cual no fue observable en los cultivos a 30°C. Todos los cultivos a 24°C demandaron más oxígeno y metanol que los cultivos realizados a 30°C. Todas las velocidades específicas de crecimiento (μ) y los rendimientos celulares derivados del metanol ($Y_{x/s}$) aumentaron al disminuir la temperatura en la etapa de inducción (μ : 18 veces para KM71FTEII, y 5 veces para KM71HGH y KM71pPIC9; $Y_{x/s}$: 7 veces para KM71FTEII, y 3 veces para KM71HGH y KM71pPIC9). A 30°C la μ y el $Y_{x/s}$ de la cepa KM71FTEII fue 3.1 y 3.0 veces menor respecto a la cepa KM71pPIC9, mientras que a 24°C, hubo un aumento de la μ (1.3 veces) y una disminución del $Y_{x/s}$ (1.1 veces) respecto a la cepa sin gen heterólogo. Para la cepa KM71HGH a 30°C, la μ y el $Y_{x/s}$ fueron 1.3 veces mayor y 1.1 veces menor, respectivamente, respecto a la cepa KM71pPIC9, mientras que a 24°C, hubo un aumento de la μ (1.3 veces) y del $Y_{x/s}$ (1.04 veces), respecto a la cepa

KM71pPIC9. Los rendimientos de producción extracelular de proteínas recombinantes respecto a biomasa ($Y_{p/x}$) o proveniente del metanol ($Y_{p/s}$) de las dos cepas recombinantes fueron muy diferentes ($Y_{p/x}$: 0.026 y 0.052 g/g, $Y_{p/s}$: 0.017 y 0.022 g/g para la cepa KM71FTEII a 30 y 24°C; $Y_{p/x}$: $3 \cdot 10^{-5}$ y $4 \cdot 10^{-5}$ g/g, $Y_{p/s}$: 10^{-5} y 10^{-5} g/g para la cepa KM71HGH a 30 y 24°C), siendo mayores en la cepa KM71FTEII, y siempre mayores en los cultivos a 24°C que a 30°C. Un análisis por RT-qPCR a las 47 h de inducción de la expresión de 20 genes involucrados en las rutas del metabolismo del metanol o de la secreción de proteínas mostró que al disminuir la temperatura de 30 a 24°C se sobreexpresaron todos los genes analizados en las tres cepas estudiadas, destacando genes del metabolismo del metanol y los genes SSA2 y KAR2 que codifican para chaperonas. Sin embargo, el número de genes que se sobreexpresaron y subexpresaron por efecto de la presencia del gen heterólogo fue diferente, e incluso diferente a cada temperatura.

Conclusiones. La disminución de la temperatura en la etapa de inducción condujo a un aumento en la actividad metabólica de las células, que aumentó la μ y el $Y_{x/s}$. Además, la disminución de la temperatura también redujo el estrés por carga metabólica originado por la producción de la proteína recombinante, y el estrés generado por el cambio del pH y la fuente de carbono al inicio de la etapa de inducción. Aunque las tres cepas tuvieron un comportamiento similar en el crecimiento celular y en los valores de $Y_{x/s}$, el incremento en la μ y $Y_{x/s}$ que resultó a partir de la disminución de la temperatura fue diferente para las tres cepas. A pesar que los dos genes heterólogos poseen codones preferenciales de *P. pastoris*, los rendimientos de producción extracelular de la proteína recombinante ($Y_{p/x}$ y $Y_{p/s}$) de las dos cepas recombinantes fueron diferentes, probablemente debido a una diferente expresión de los genes involucrados en la secreción de proteínas.

Agradecimientos. Agradecemos el apoyo por parte del CONACYT (CB-2010-156719). MAGS, JAFG, JEHA, y KBFC agradecen la beca del CONACYT.

Bibliografía.

1. Mattanovich, D., Gasser, B., Hohenblum, H., Sauer, M. (2004). Stress in recombinant protein producing yeasts. *J. Biotechnol.* 113(1): 121-135.