



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN UN BIOPROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA FITASA TERMOESTABLE EN *PICHIA PASTORIS*

Miguel Castillo-Galván, María Magdalena Iracheta-Cárdenas, Martha Guerrero-Olazarán, José María Viader-Salvadó
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
San Nicolás de los Garza, C.P. 66450. jose.viadersl@uanl.edu.mx

Palabras clave: Pichia pastoris, fitasa termoestable, temperatura de cultivo

Introducción. *Pichia pastoris* es un microorganismo psicrotrófico que puede crecer a una temperatura de 12°C ($\mu = 0.04 \text{ h}^{-1}$) y ha sido ampliamente reconocido para la expresión de genes heterólogos. Reportes recientes indican que los cultivos de *P. pastoris* a temperaturas menores de 30°C conducen a un aumento en los niveles de producción de proteínas recombinantes, debido a diversas causas probables como son: un mejor plegamiento, incremento de la secreción y disminución de la proteólisis (1). Nuestro grupo de trabajo desarrolló una cepa de *P. pastoris* productora de una fitasa termoestable con estructura de hélice (FTEII), y con propiedades atractivas para su producción industrial (2).

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la temperatura (20 y 30°C) en un bioproceso para la producción de la fitasa FTEII en cepas de *P. pastoris*.

Metodología. Se empleó una cepa recombinante de *P. pastoris* Mut^s KM71, construida previamente en nuestro laboratorio (2), que produce y secreta la fitasa FTEII (KM71FTEII). Se realizaron dos cultivos en un biorreactor de 5 L 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⁻¹ 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 350 g h⁻¹ de peso húmedo para el inicio de la etapa de inducción (17 h), alimentando glicerol al 50% (12 mL L⁻¹ de Biotina 0.02% y PTM1). La última etapa se inició después de 45 min de ausencia de alimentación, alimentando con metanol por 68 h. La concentración de metanol en el medio de cultivo se mantuvo constante a 1 g L⁻¹ con ayuda de un controlador ON/OFF de metanol y la temperatura se fijó a 20 ó 30°C a lo largo de la inducción. Ambos cultivos fueron evaluados en el consumo de metanol, crecimiento celular (peso húmedo en g L⁻¹), concentración de proteínas totales extracelulares (Bradford), niveles de producción intra y extracelular de FTEII por Dot blot, utilizando anticuerpos específicos contra la FTEII, así como la actividad de fitasa en el medio de cultivo libre de células (U L⁻¹).

Resultados. El cultivo a menor temperatura (20°C) presentó una mayor demanda de oxígeno que el cultivo a 30°C, y fue necesario administrar mezclas de aire-oxígeno para mantener el oxígeno disuelto por arriba del 20%. También presentó mayor consumo de metanol (1453 vs 254 mL) para satisfacer la consigna de la concentración constante de metanol de 1 g L⁻¹ en el medio de cultivo, evidenciando con esto una mayor actividad metabólica a 20 que a 30°C. Además, a 20°C se incrementó la biomasa en un 53% (520 vs 339 g L⁻¹), las proteínas totales secretadas en un 81% (32 vs 18 g L⁻¹) y los niveles de fitasa extracelular hasta en un 129% (78,956 vs 34,541 U L⁻¹), con una mayor producción FTEII por unidad de biomasa (152 vs 102 U g⁻¹). Por último, los niveles de FTEII intracelular fueron de un 8% en el cultivo a 20°C y de un 19% a 30°C, indicando una mejor secreción en los cultivos a menor temperatura.

Conclusiones. El cultivo de la cepa KM71FTEII a 20°C en la etapa de inducción fue metabólicamente más activo y más eficiente en la producción y secreción de FTEII que el cultivo a 30°C, demostrando que la disminución de la temperatura favorece la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*.

Agradecimientos. Agradecemos el apoyo económico del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICyT) de la UANL. MCG agradece la beca otorgada por el CONACYT.

Bibliografía.

1. Dragosits M, Frascotti G, Bernard-Granger L, Vázquez L, Giuliani F, Baumann M, Rodríguez-Carmona K, Maurer M, Gasser B, Sauer M, Ferrer P, Mattanovich D. 2011. Influence of growth temperature on the production of antibody Fab fragments in different microbes: A host comparative analysis. *Biotechnol. Prog.* 27(1): 38-46.
2. Viader-Salvadó JM, Gallegos-López JA, Carreón-Treviño JG, Castillo-Galván M, Rojo-Domínguez A, Guerrero-Olazarán M. 2010. Design of thermostable beta-propeller phytases with a broad range of pH activity and their overproduction by *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(19): 6423-6430.