



TOXICIDAD DIFERENCIAL POR METANOL EN MEDIO LÍQUIDO Y MEDIO SÓLIDO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LACASA EN *Pichia pastoris*

¹Marcos López, ¹Helue García, ¹Saúl Tlecutli, ²Octavio Loera, ²Francisco J. Fernández, y ²Gustavo Viniegra.

¹Departamento de Investigación y Posgrado, Universidad Politécnica de Tlaxcala, Tepeyanco, Tlaxcala, C.P. 90180

²Depto. de Biotecnología, UAM-Iztapalapa, C.P. 09340, D.F. e-mail: marco.lopez@uptlax.edu.mx

Palabras clave: Pichia pastoris, lacasa, cultivo en medio sólido.

Introducción. *P. pastoris* es una levadura que se ha empleado en la expresión de proteínas recombinantes en numerosos trabajos^{1,2}; estas enzimas se pueden expresar, bajo el control del promotor AOX1, inducible por metanol³. La mayor parte de trabajos se han hecho en cultivos líquidos (CL)³.

El objetivo de este trabajo fue analizar las diferencias del efecto de altas concentraciones de metanol, sobre la producción de biomasa y la expresión de lacasa, en medios sólidos (CS) y líquidos.

Metodología. Se midió la biomasa (g, peso seco) generada, así como la actividad heteróloga, bajo distintas condiciones de cultivo: espuma de poliuretano (PUF) para CS y en matraz agitado para CL, 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 C. Este tiempo se incrementó proporcionalmente a la cantidad de glicerol inicial: (48, 72 y 192h), respectivamente.

Resultados. La utilización de concentraciones elevadas de metanol (63.2 g L⁻¹), causó diferencias significativas entre CL y CS en cuanto a la cantidad de lacasa heteróloga medida después de 48h de inducción (Fig.1).

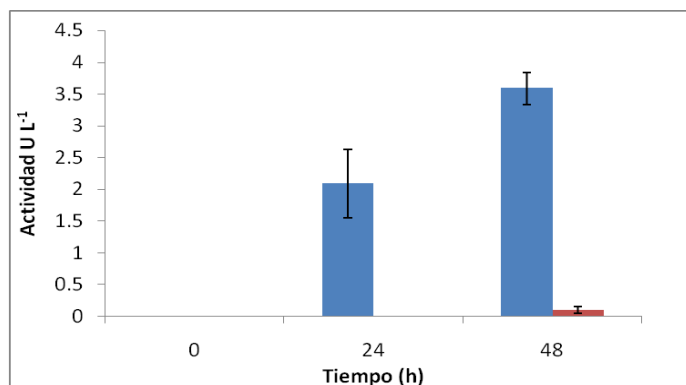


Fig. 1. Valores de actividad enzimática encontrados con 63.2 g L⁻¹ de metanol. CS ▲ CL ▲.

En experimentos análogos, se estudió el efecto del soporte utilizado (CS o CL) sobre la producción de

biomasa utilizando 90.4 g L⁻¹ de glicerol, con y sin metanol (Tabla1.)

Tabla 1. Rendimiento (gramo de biomasa g (X) por gramo de carbono g (C) de la producción de biomasa en función del tipo de cultivo (CS ó CL) y presencia o ausencia de metanol.

Tratamiento	[metanol] (g L ⁻¹)	Rendimiento g(X)/g(C)
CL	0	1.17 ± 0.24 ^a
CL	7.9	0.86 ± 0.25 ^b
CS	0	1.48 ± 0.21 ^a
CS	7.9	1.14 ± 0.18 ^b

Conclusiones. La relación elevada del cociente Área/Volumen, de un líquido fermentable disperso en espuma de poliuretano (CS), tiene un efecto muy favorable sobre la atenuación del efecto tóxico que ejerce el metanol. Esto repercute en la producción de lacasa heteróloga, cuando se utilizan elevadas concentraciones de metanol (63.2 g L⁻¹), comparado con el CL. Por otra parte esta misma característica, permite en los CS una atenuación de la toxicidad del metanol en cuanto a la producción de biomasa, en presencia de metanol comparado con el CL.

Agradecimiento.

A CONACYT por el financiamiento de la investigación (N° Becario 202365).

Bibliografía.

1. Cereghino JL and Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbio Rev* 24: 44-56.
2. J O'Callaghan, MM O'Brien, K McClean and ADW Dobson (2002) Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29, 55-59.
3. Roggenkamp R, Z Janowicz, B Stainkoxski and CP Hollen 1984. Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from methylotrophic yeast *Hansenula lypomorpha*. *Mol Gen Genet* 194: 489-493.