



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CULTIVO DE DOS CEPAS DE *PICHIA PASTORIS* (Mut^s) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE DOS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Mauricio Castillo-Galván, Miguel Castillo-Galván, José A. Fuentes-Garibay, Melissa I. Leija-Salazar, Mónica B. Félix-Castro, Eddy L. Cab-Barrera, M. Magdalena Iracheta-Cárdenas, José M. Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66450. martha.guerrero@uanl.edu.mx

Palabras clave: *Pichia pastoris*, fitasa termoestable, hormona del crecimiento humano

Introducción. El stress y la respuesta metabólica que se presenta por la sobre-expresión de genes heterólogos y las condiciones ambientales, afectan la productividad de un hospedero empleado en la producción de proteínas recombinantes. *Pichia pastoris* es un microorganismo reconocido para la expresión de genes heterólogos que ha sido estudiado por nuestro grupo de trabajo como modelo de estudio para la producción de diferentes proteínas recombinantes.

Con el fin de evaluar el efecto de la temperatura de cultivo sobre los niveles producción y secreción de dos diferentes proteínas recombinantes, en el presente trabajo se evaluaron cultivos a 20 y 30°C de una cepa de *P. pastoris* productora de la hormona del crecimiento humano de 22 kDa (HGH22K) y una cepa de *P. pastoris* productora de una fitasa termoestable (FTEII).

Metodología. Se emplearon las cepas de *P. pastoris* KM71HGH22K y KM71FTEII que tienen integrado en su genoma el gen heterólogo fusionado a la secuencia prepro del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y su expresión es regulada por el promotor AOX1. Las colonias portadoras de los genes heterólogos se crecieron en YPD hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 6-8. Con este cultivo se inoculó en 100 mL de BMG (1.34% YNB, 100 mM de fosfato de potasio [pH 6], 4x10⁻⁵% biotina, 1% de glicerol), y se incubó a 30°C, 250 rpm por 12 h hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 6-7. Las células del cultivo en BMG se cosecharon y se cultivaron en 20 mL de medio BMM (1.34% YNB, 100 mM de fosfato de potasio [pH 6], 4x10⁻⁵% biotina y 0.75 % de metanol) a 20 ó 30°C, 250 rpm por 72 h y adición de metanol cada 12 h. Se lisaron los paquetes celulares y se recuperaron las proteínas solubles intracelulares. Los niveles de HGH22K y FTEII intra y extracelular se determinaron por ELISA con anticuerpos específicos para cada proteína. Además, los niveles extracelulares de FTEII se determinaron por actividad enzimática de fitasa (1). También, se determinaron niveles de proteínas totales (Bradford) y proteasas en el medio de cultivo y se realizaron análisis por SDS-PAGE de los mismos. Por último se realizaron cinéticas de crecimiento de ambas cepas en cultivos de 48 h a las dos temperaturas en estudio.

Resultados. Los cultivos a las dos temperaturas de ambas cepas presentaron una cinética de crecimiento en

dos etapas, en la primera etapa (0-12 h) las velocidades específicas de crecimiento fueron iguales ($\mu = 0.018-0.021 \text{ h}^{-1}$) a las dos temperaturas evaluadas, mientras que en la segunda etapa (20-48 h), los cultivo a 20°C presentaron valores 1.7 más altos de μ que los obtenidos a 30°C. Los cultivos de ambas cepas a 20°C presentaron incrementos en los niveles de proteínas totales en el medio de cultivo de hasta un 152% para el caso de HGH22K y 298% para FTEII. Sin embargo los niveles de proteínas totales para el cultivo de KM71FTEII fueron hasta 21 veces más altos que los obtenidos en el cultivo de KM71HGH22K. Es importante señalar que los niveles de proteínas totales en el medio de cultivo disminuyeron con el tiempo indicando una probable degradación. Los niveles de HGH22K y FTEII extracelular fueron más elevados para los cultivos a 20°C, produciendo hasta 2.7 y 7.4 veces más de HGH22K y FTEII, respectivamente, que a 30°C. Mientras que los niveles de HGH22K fueron en la escala de $\mu\text{g/mL}$, los niveles de FTEII fueron 1000 veces más elevados (mg/mL). Respecto a la secreción, los niveles de HGH y FTEII intracelular oscilaron en valores de 2 a 23% y siempre fueron menores en los cultivos a 20°C que a 30°C. La actividad de proteasas fue hasta 4.9 veces más elevada en los cultivos a 30°C que en los cultivos a 20°C. Las diferencias encontradas en los parámetros evaluados entre las dos cepas, pueden deberse a: la presencia de codones preferenciales en la secuencia que codifica para FTEII y la diferencia en la estabilidad a la proteólisis entre ambas proteínas.

Conclusiones. A pesar que el efecto de la temperatura de cultivo fue similar en ambas cepas en cuanto a la respuesta de los parámetros evaluados, las características de los genes heterólogo y las proteínas recombinantes producidas influyeron en respuestas diferentes generadas por cada cepa.

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

Bibliografía.

1. J.M. Viader-Salvadó, J.A. Gallegos-López, J.G. Carreón-Treviño, M. Castillo-Galván, A. Rojo-Domínguez, M. Guerrero-Olazarán. 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.