

ALTOS NIVELES DE EXPRESION Y RECOBRADO DE LA PROTEINA rBm86 EN LA LEVADURA *Pichia pastoris* PARA USO VETERINARIO

Ivonne Rodríguez, Arturo González, Catalina Alvarez, Rafael Fernández, David Diago, José A. Acosta. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, Ciudad de la Habana CP 10600, Cuba. E-mail:

Ivonne.Rodriguez@cigb.edu.cu

Bm86, Pichia pastoris, fermentación

Introducción. La proteína Bm86, natural de las células epiteliales del tubo digestivo de la garrapata *Boophilus microplus*, ha demostrado que debido a su alta inmunogenicidad confiere protección a los bovinos contra la infestación de este parásito. Ha sido reportado el clonaje y expresión de Bm86 en *E. Coli* y *Aspergillus nidulans* pero con bajos niveles de expresión y recobrado(1). En nuestro centro se logró el clonaje de la proteína Bm86 en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* con altos niveles de expresión (2) y el proceso de producción de esta proteína ha sido descrito por Canales *et al* (3). La obtención de altas densidades celulares y elevados niveles de expresión de proteínas foráneas requiere mantener una adecuada concentración de O₂ disuelto en el cultivo. El siguiente trabajo tiene como objetivo la evaluación a escala de 120 L de un nuevo esquema de cultivo que permita aumentar la expresión de la proteína rBm86.

Metodología. Se trabajó con la cepa *Pichia pastoris* MB9 (Mut^s), la cual contiene el gen que codifica para la producción de la proteína Bm86. Se determinó la composición elemental de dicha levadura durante el crecimiento en glicerol y metanol y se diseñó el medio de cultivo químicamente necesario(4). Se utilizó un fermentador modelo BL200 (Biolafitte, Francia) de 120 L volumen efectivo con control automático de temperatura (30 °C), agitación, pH (5.5), nivel de espuma, presión e indicación de flujo de aire y concentración de O₂ disuelto. Después de caracterizar la transferencia de O₂ del fermentador utilizado y determinar la demanda de O₂ de este cultivo(5), se propuso un nuevo esquema de cultivo. Fue cuantificada la expresión durante el transcurso de la fermentación y se realizó el proceso de purificación evaluándose la calidad del producto final.

Resultados y discusión. Los resultados promedio de 3 fermentaciones de 120 L con el nuevo esquema de cultivo evidencian que durante la primera fase de crecimiento en metanol (en la cual se incrementó el flujo de forma exponencial) se obtuvo mayor velocidad específica de crecimiento y mayor rendimiento biomasa/sustrato que en la segunda fase en la cual se mantuvo constante el flujo de metanol para lograr mas de 15 % de O₂ disuelto (Tabla 1). De forma global durante todo el tiempo de crecimiento en metanol se obtuvo mayor velocidad de crecimiento y rendimiento que con el esquema de cultivo actual, en el cual durante la mayor parte del tiempo de crecimiento en metanol y expresión de la proteína rBm86 el cultivo estaba limitado por oxígeno.

Tabla 1. Resultados comparativos de los 2 esquemas de cultivo

Parámetros	Esquema actual	Nuevo esquema
rpm y vvm	300-500 rpm, 1vvm	500 rpm y 0.78 vvm
Presión	0.3 atm	0.8 atm
Inducción	1 % v/v MeOH a 20 g _{bs} /L	0.7 % v/v MeOH a 10 g _{bs} /L
Flujo	F=0.1244*X*V, c/3h hasta 70 g _{bs} /L	F1=140*e ^(0.035*t) 31 h F2=3.5 mL/L.h hasta 112 h
Resultados durante la fase de crecimiento en metanol		
(h ⁻¹)	Global: 0.016 ± 0.003	F1: 0.034 F2: 0.011 Global: 0.020 ± 0.002
Y _{Xs} (g _{bs} /gm)	Global: 0.18 ± 0.03	F1: 0.50 F2: 0.20 Global: 0.28 ± 0.02
Expresión (g rBm86/L)	1.455 ± 0.249	3.12 ± 0.05

La cinética de expresión evidenció que durante todo el tiempo de crecimiento en metanol se incrementa la cantidad de proteína por litro de cultivo y la relación gramos de rBm86 por gramo de biomasa.

Conclusiones. Con el nuevo esquema de cultivo se logró aumentar 2 veces la expresión y la productividad en la etapa de fermentación. El rendimiento del proceso de producción de rBm86 se duplicó, con valores de recobrado de un 20 %. Se obtuvo un producto final con igual calidad

Bibliografía

- Rand, K.N, Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Telleman, P. (1989). Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. Vol(86):9657-9661.
- Rodríguez, M., Rubiera, R., Penichet, M., Montesinos, R., Cremata J., Falcón, V.(1994). High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *Journal of Biotechnology*. Vol(o33): 135 –146.
- Canales, M., Enríquez, A., Ramos, E., Cabrera, D., Dandie, H., Soto, A., Falcón, V., Rodríguez, M. and de la Fuente, J.(1997). Large scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine GAVAC TM against cattle tick. *Vaccine*. Vol(15): 414-422.
- Alvarez, C., Ramos, E., Enríquez, A.(1997). Variación de la composición elemental de la levadura *Pichia pastoris* durante la expresión de proteínas heterólogas. *Aplicaciones médicas de la biotecnología, vol(4)*. Biotecnología Habana '97, P32.
- Fernández, R., Rodríguez, I., Diago, D. (1999). Caracterización de la transferencia de oxígeno en fermentadores Biolafitte a escala de laboratorio. *Aplicaciones médicas de la biotecnología, vol(5)*. Biotecnología Habana '99, P14.