

PRODUCCION DE CUTINASA ANCUT 3 DE *Aspergillus nidulans* EN *Pichia pastoris* PX33 EN BIORREACTOR DE 1 L.

Lovera Daniela¹, Torres Magda Karina¹, Castro Rodríguez José Augusto¹, Peña Montes Carolina², Blancas Abel³, Valdés Norma Adriana³, Trujillo Mauricio³ y Farrés Amelia¹. ¹ Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México, 04510. ² UNIDA, Instituto Tecnológico de Veracruz, 91897 Veracruz, ³ Unidad de Bioprocesos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México, 04510 farres@unam.mx

Palabras clave: cutinasa, *Pichia pastoris*, biorreactor.

Introducción. Las cutinasas (ec 3.1.1.74) son enzimas hidrolíticas con estructura de $\alpha\beta$ hidrolasas, que comparten actividad sobre sustratos de esterases y lipasas en algunos casos. Se han explorado aplicaciones en diversos campos biotecnológicos, incluidas la síntesis de compuestos de química fina, producción de biodiesel y degradación de poliésteres (1). El grupo de trabajo ha caracterizado el sistema cutinolítico de *Aspergillus nidulans* (2) y ha propuesto que cada una de las cuatro enzimas que lo componen tiene un papel único en la fisiología fungal. Por sus propiedades, las aplicaciones de las mismas son diferentes. Se ha demostrado también que la cutinasa ANCUT3 tiene capacidad de degradación de diversos poliésteres: polibutylensuccinato, ácido poliláctico, policaprolactona y polietilentereftalato (3). Por lo tanto, resulta de interés el lograr producir la misma en fermentación sumergida, bajo condiciones controladas. En trabajos previos se logró escalar la producción a nivel de biorreactor de 1 L empleando como criterio de escalamiento el k_{La} para la enzima ANCUT1, tras determinarlo de manera experimental a nivel matraz (4). El sistema de expresión de *P. pastoris* ha sido empleado para numerosos casos de expresión heteróloga, y para cutinasas existen pocos ejemplos.

En virtud de que se cuenta con las clonas conteniendo los genes de cada una de las cutinasas en el mismo vector (pPICZ α A) y la misma cepa hospedera, *P. pastoris* X33, se decidió explorar la misma metodología de análisis para determinar las condiciones de producción de ANCUT3 en biorreactor de 1 L a fin de poder producirla eventualmente a mayor escala. En este vector de expresión el control de la misma se ejerce por la presencia de metanol como inductor en el medio de cultivo. Se exploraron las cantidades del mismo a emplearse, así como el tiempo de adición y el efecto del control de pH sobre la producción de enzima y crecimiento, en comparación con glicerol.

Metodología. En términos generales se emplearon los medios de cultivo señalados por el manual de Invitrogen(5). El seguimiento del crecimiento se hizo por densidad óptica, se cuantificó proteína por el método de Bradford y se verificó la producción de la enzima en zimogramas y geles SDS PAGE. Se hicieron pruebas a nivel matraz con diferentes volúmenes de llenado y velocidades de agitación para obtener diferentes coeficientes de transferencia de oxígeno. Los mejores resultados se probaron en un biorreactor Applikon con dos baffles, volumen nominal de 1.5 L y volumen de llenado de 1 L, de la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Resultados. El comportamiento de la producción de enzima respondió al efecto de las variaciones en el coeficiente k_{La} . En

matraz se determinó que la concentración de metanol a emplear era de 0.5% y que el k_{La} idóneo era 96 h^{-1}

Tabla 1. Comparación de resultados obtenidos en matraz y en biorreactor.

PARAMETRO	MATRAZ	BIORREACTOR
TIEMPO	48 H	21 H
PULSOS METANOL	1	2
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.384	0.214
Actividad volumétrica (U/mL)	501	524
Actividad específica (U/mg)	4316	6237
$Q_p \text{ (U/L/h)}$	10431	24950

Conclusiones. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de producción en el biorreactor son mayores que en el matraz. Por otra parte, cabe destacar que el comportamiento cinético de la fermentación es diferente al obtenido con ANCUT1, lo que implica que factores relacionados con la secuencia genética insertada afectan la capacidad de crecimiento y demanda de oxígeno.

Agradecimientos. DGAPA PAPIIT IT203118, Proyecto Semilla Facultad de Química y PAIP 5000-9095.

1. Chen S et al. (2013) *Biotechnol Adv* 31(1) 1754-176
2. Bermúdez, E. et al. (2019). *Appl Microbiol Biotechnol*. doi /10.1007/s00253-019-09712-3
3. Llanos, A. (2018) Tesis Maestría, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM
4. Castro, J.A. (2017) Tesis Maestría, Posgrado en <ciencias Bioquímicas, UNAM
5. Invitrogen Easy Select *Pichia* expression kit.

