

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA



RESPUESTA DIFERENCIAL ENTRE CULTIVO SÓLIDO Y CULTIVO  
LÍQUIDO EN LA FISIOLÓGÍA DE CRECIMIENTO Y LA EXPRESIÓN  
HETERÓLOGA DE UNA LACASA EN *Pichia pastoris*:

TESIS

Para obtener el grado de

**Doctor en Biotecnología**

**PRESENTA**

**MARCOS LÓPEZ PÉREZ**

**DIRECTOR**

**Dr. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ**

**MÉXICO DF**

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Aspectos generales del género <i>Pichia</i></b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>1.1. <i>P. pastoris</i> como hospedero para la producción de proteínas recombinantes</b> .....                               | <b>1</b>  |
| <b>1.2. Metabolismo del glicerol en <i>P. pastoris</i></b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>1.2.1. Transporte del glicerol</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>1.3. Metabolismo del etanol en <i>P. pastoris</i></b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>1.4. Represión por carbono</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>1.5. Inactivación por carbono</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>1.6. Los peroxisomas en el metabolismo del metanol</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>1.7. Caracterización y regulación de la expresión génica de la alcohol oxidasa (<i>AOXI</i>) de <i>P. pastoris</i></b> ..... | <b>12</b> |
| <b>1.8. Otros promotores para la expresión heteróloga</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>1.9. Cepas empleadas para la producción heteróloga</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>2. Vectores de expresión</b> .....   | <b>16</b> |
| <b>2.1. Integración del vector al genoma de <i>P. pastoris</i></b> .....  | <b>17</b> |
| <b>3. Fermentaciones con <i>P. pastoris</i></b> .....   | <b>20</b> |
| <b>4. Factores que influyen en la producción de proteínas heterólogas</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>4.1. Fenotipo de clones en la utilización de metanol</b> .....   | <b>22</b> |
| <b>4.2. Dosis génica</b> .....  | <b>22</b> |
| <b>4.3. Porcentaje de A+T</b> .....   | <b>23</b> |
| <b>4.4. Uso de codones preferenciales</b> .....   | <b>23</b> |
| <b>4.5. Estabilidad del mRNA</b> .....  | <b>24</b> |
| <b>4.6. Secuencia señal para la secreción</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>4.7. Estabilidad del producto</b> .....  | <b>26</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5. Bioprocesos con <i>P. pastoris</i></b>  | <b>27</b> |
| <b>5.1. Estrategias de fermentación para la producción de proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i></b>                         | <b>27</b> |
| <b>5.2. Fermentación en cultivo alimentado o cultivos en fed-batch</b>  | <b>29</b> |
| <b>5.3. Fermentación en cultivo continuo</b>  | <b>30</b> |
| <b>5.4. Cepas Mut<sup>+</sup> (methanol utilization positive)</b>   | <b>31</b> |
| <b>5.5. Cepas methanol utilization slow Mut<sup>s</sup></b>   | <b>32</b> |
| <b>5.6. Cepas mut<sup>-</sup> (methanol utilization negative)</b>   | <b>34</b> |
| <b>5.7. Medios de cultivo</b>   | <b>35</b> |
| <b>5.8. Suministro de oxígeno y agitación</b>   | <b>35</b> |
| <b>5.9. Etapa de inducción o <i>fed-batch</i> con metanol</b>   | <b>36</b> |
| <b>6. Lacasas, un tipo de multicobre oxidasas</b>   | <b>37</b> |
| <b>6.1. Procesamiento y secreción de las lacasas</b>  | <b>40</b> |
| <b>6.2. Aspectos biotecnológicos</b>  | <b>40</b> |
| <b>6.3. Regulación génica de las lacasas</b>  | <b>45</b> |
| <b>6.4. Funciones biológicas de las lacasas</b>   | <b>46</b> |
| <b>7. Aspectos fundamentales de la fermentación en medio sólido</b>   | <b>46</b> |
| <b>7.1. Definición</b>  | <b>46</b> |
| <b>7.2. Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido comparado con la fermentación en medio sumergido ó liquido</b> | <b>47</b> |
| <b>7.3. Influencia de los factores ambientales en estado sólido</b>   | <b>48</b> |
| <b>JUSTIFICIACIÓN</b>   | <b>49</b> |
| <b>HIPÓTESIS</b>  | <b>50</b> |
| <b>OBJETIVO</b>   | <b>51</b> |

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Microorganismos utilizados</b>   | <b>52</b> |
| <b>1.1. Vectores de clonación utilizados</b>                                     | <b>52</b> |
| <b>2. Condiciones de cultivo</b>   | <b>52</b> |
| <b>2.1. Medios sólidos para bacterias</b>  | <b>52</b> |
| <b>2.2. Medios líquidos para bacterias</b>                                       | <b>52</b> |
| <b>2.3. Conservación de cepas bacterianas</b>                                    | <b>52</b> |
| <b>2.4. Medios sólidos para levaduras</b>  | <b>53</b> |
| <b>2.5. Medios líquidos para la conservación y propagación de levaduras</b>      | <b>53</b> |
| <b>2.5.1. Composición de los medios BMG/BMM</b>                                  | <b>54</b> |
| <b>3. Protocolo de conservación de cepas de levaduras</b>                        | <b>54</b> |
| <b>3.1. Almacenamiento a medio plazo</b>   | <b>54</b> |
| <b>3.2. Almacenamiento a largo plazo</b>   | <b>55</b> |
| <b>3.3. Protocolo de conservación</b>  | <b>55</b> |
| <b>4. Obtención de biomasa para la extracción de ácidos nucleicos</b>            | <b>55</b> |
| <b>4.1. Soluciones utilizadas para la extracción de DNAg en levaduras</b>        | <b>56</b> |
| <b>4.2. Protocolo de obtención de DNA genómico</b>                               | <b>56</b> |
| <b>4.3. Soluciones utilizadas para la extracción DNA de plasmídico</b>           | <b>57</b> |
| <b>4.4. Protocolo de extracción de DNA plasmídico</b>                            | <b>57</b> |
| <b>5. Obtención de células calcio competentes</b>                                | <b>58</b> |
| <b>5.1. Protocolo para la obtención de células calcio-competentes</b>            | <b>58</b> |
| <b>5.2 Soluciones utilizadas para la obtención de células calcio-competentes</b> | <b>59</b> |
| <b>6. Obtención de transformantes de células de <i>P.pastoris</i></b>            | <b>59</b> |
| <b>7. Reacciones con endonucleasas de restricción</b>                            | <b>60</b> |
| <b>7.1. Endonucleasas de restricción utilizadas</b>                              | <b>60</b> |
| <b>7.2. Protocolo para las reacciones de restricción</b>                         | <b>61</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>8. Clonación del gen <i>LAC1</i> en el DNAg de <i>P. pastoris</i></b>   | <b>61</b> |
| <b>8.1. Construcción del vector de transformación de <i>P. pastoris</i> pPIC9Lac</b>   | <b>61</b> |
| 8.1.1. Vectores de clonación utilizados  | 61        |
| 8.1.2. Reacción de ligación con el vector TOPO TA cloning  | 62        |
| 8.1.3. Secuenciación de ácidos nucleicos   | 62        |
| 8.1.4. Identificación de secuencias en bases de datos  | 63        |
| 8.1.5 Reacción de ligación para fragmentos F1, F2 y vector pPIC9   | 63        |
| 8.1.6. Estrategia para la construcción del vector pPIC9Lac   | 63        |
| 8.1.7 Protocolo de transformación del vector TOPO TA cloning   | 65        |
| <b>9. Electroforesis en geles de agarosa</b>   | <b>65</b> |
| 9.1. Cuantificación del DNA genómico   | 66        |
| <b>10. Amplificaciones sobre DNA genómico</b>  | <b>66</b> |
| 10.1. Amplificaciones de regiones adyacentes al gen que codifica el gen de <i>Lac1</i> de <i>T. versicolor</i> dentro de pGEMLac | 66        |
| 10.2. Cebadores  | 67        |
| 10.2.1. Condiciones de amplificación   | 67        |
| 10.2.1.1. Amplificación de la región <i>Lac1</i>   | 67        |
| 10.1.2.2. Concentración molar de los componentes en la mezcla de PCR   | 68        |
| <b>11. Purificación de fragmentos de DNA</b>   | <b>68</b> |
| 11.1 Protocolo para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa  | 69        |
| <b>12. Soporte sólido para las fermentaciones en sistemas FMS en levaduras</b>   | <b>69</b> |
| <b>13. Protocolo para el monitoreo de la biomasa en las fermentaciones</b>   | <b>70</b> |
| 13.1. Medida de biomasa en sistema FML   | 70        |
| 13.2. Medida de biomasa es sistemas FMS  | 71        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>14. Estrategia general para la construcción de las cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i></b> ..... | <b>71</b> |
| <b>15. Determinación del glicerol y tartrato de amonio</b> .....  | <b>72</b> |
| <b>16. Cuantificación de la actividad lacasa</b> .....  | <b>73</b> |
| <b>17. Toma de micrografías</b> .....   | <b>73</b> |
| <b>18. Metodología para la inducción de la expresión heteróloga sobre los cultivos...</b>                 | <b>74</b> |

## RESULTADOS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Identificación de la ORF de la lacasa de <i>Trametes versicolor</i></b> .....  | <b>75</b> |
| <b>2. Amplificaciones sobre el vector pGMELac</b> .....  | <b>76</b> |
| <b>3. Caracterización mediante reacción de restricción del vector TOPO FI</b> .....  | <b>77</b> |
| <b>4. Caracterización mediante reacción de restricción del vector TOPO FII</b> .....   | <b>79</b> |
| <b>5. Caracterización mediante PCR de los vectores TOPO FI y FII</b> .....   | <b>80</b> |
| <b>6. Reacción de ligación para la construcción del vector pPIC9Lac</b> .....  | <b>81</b> |
| <b>7. Caracterización mediante restricción del vector pPIC9Lac</b> .....   | <b>82</b> |
| <b>8. Caracterización mediante amplificación del vector pPIC9Lac</b> .....   | <b>83</b> |
| <b>9. Confirmación de la presencia del gen <i>LAC1</i> en el DNAg de <i>P. pastoris</i></b> .....  | <b>84</b> |
| <b>10. Selección de clones transformantes</b> .....  | <b>86</b> |
| <b>11. Identificación de la lacasa heteróloga en el sobrenadante de la fermentación de los clones transformantes</b> .....   | <b>87</b> |
| <b>12. Evaluación del crecimiento de la cepa GS115Lac en condiciones de relación C/N desbalanceadas</b> .....  | <b>88</b> |
| <b>12.1. Cinética de crecimiento de la cepa GS115Lac en cultivos FML</b> .....   | <b>88</b> |
| <b>12.2. Cinética de crecimiento de la cepa GS115Lac en cultivos FMS</b> .....   | <b>90</b> |
| <b>12.3. Evaluación del efecto de la variación del cociente C/N sobre la variable <math>\mu</math> bajo las condiciones de los experimentos de los apartados 12.1 y 12.2</b> ..... | <b>91</b> |
| <b>13. Evaluación del efecto de la fuente de nitrógeno en el crecimiento y la evolución del pH en FML y FMS</b> .....  | <b>92</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>14. Evaluación del crecimiento de la cepa GS115lac en medios con cociente C/N balanceado</b>   | <b>94</b>  |
| <b>15. Evaluación del efecto de la incorporación de metanol en tiempo cero sobre el crecimiento y la actividad enzimática en fermentaciones con altas concentraciones de glicerol iniciales</b> | <b>96</b>  |
| <b>16. Evaluación del efecto de la adición de metanol en ausencia de glicerol, sobre la actividad enzimática en estadios posteriores a la fase exponencial de crecimiento,</b>                  | <b>99</b>  |
| <b>16.1. Efecto sobre la biomasa</b>  | <b>99</b>  |
| <b>16.2. Efecto sobre la actividad enzimática</b>   | <b>101</b> |
| <b>17. Matriz de fermentaciones diseñadas para evaluar las posibles diferencias en la fisiología y la expresión heteróloga en cultivos FMS y FML</b>  | <b>102</b> |
| <b>17.1. Fermentaciones con concentraciones 9.03 g L<sup>-1</sup> glicerol inicial</b>  | <b>103</b> |
| <b>17.1.1. 9.03 g L<sup>-1</sup> glicerol inicial, 0 g L<sup>-1</sup> metanol</b>   | <b>103</b> |
| <b>17.1.2. 9.03 g L<sup>-1</sup> glicerol inicial, 7.9 g L<sup>-1</sup> metanol</b>   | <b>104</b> |
| <b>17.1.3. 9.03 g L<sup>-1</sup> glicerol inicial, 31.6 g L<sup>-1</sup> metanol</b>  | <b>106</b> |
| <b>17.2 Fermentaciones con 36.24 g L<sup>-1</sup> glicerol inicial</b>  | <b>107</b> |
| <b>17.2.1. Fermentaciones con 36.24 g L<sup>-1</sup> glicerol inicial y 0 g L<sup>-1</sup> metanol</b>  | <b>107</b> |
| <b>17.2.2. Fermentaciones con 36.24 g L<sup>-1</sup> glicerol inicial y 7.9 g L<sup>-1</sup> metanol</b>  | <b>109</b> |
| <b>17.2.3. Fermentaciones con 36.24 g L<sup>-1</sup> glicerol inicial y 31.6 g L<sup>-1</sup> metanol</b>   | <b>110</b> |
| <b>17.3 Fermentaciones con 90.4 g L<sup>-1</sup> glicerol inicial</b>   | <b>111</b> |
| <b>17.3.1. Fermentaciones con 90.4 g L<sup>-1</sup> glicerol inicial y 0 g L<sup>-1</sup> de metanol</b>  | <b>112</b> |
| <b>17.3.2. Fermentaciones con 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial y 7.9 g L<sup>-1</sup> de metanol</b>   | <b>113</b> |
| <b>17.3.3. Fermentaciones con 90.4 g L<sup>-1</sup> glicerol inicial y 31.6 g L<sup>-1</sup> de metanol</b>   | <b>114</b> |
| <b>18. Superficies de respuesta generadas a partir de la matriz de fermentaciones.</b>  | <b>116</b> |

|  |     |
|--|-----|
| 18.1. Efecto de la concentración de glicerol y la concentración de metanol sobre $\mu$ en cultivos FML y FMS .....   | 119 |
| 19. Análisis comparativo del rendimiento $U\ g^{-1}$ de biomasa generado sobre FML y FMS en condiciones de ausencia total de glicerol.....                 | 121 |
| 20 Análisis comparativo de la capacidad de atenuación de la toxicidad generada por altas concentraciones de metanol sobre cultivos sólidos y líquidos..... | 123 |
| 20.1. Análisis de la capacidad de atenuación de la toxicidad sobre la expresión heteróloga .....   | 124 |
| 20.2. Análisis de la capacidad de atenuación de la toxicidad sobre el crecimiento .....  | 125 |
| 21. Análisis comparativo de la morfología de los agregados celulares formados sobre FML y FMS .....  | 125 |
| DISCUSIÓN .....  | 130 |
| CONCLUSIONES .....   | 140 |
| PERSPECTIVAS .....   | 141 |
| BIBLIOGRAFÍA .....   | 142 |



## ÍNDICE DE TABLAS

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| Tabla 1  | Relación molar de los componentes de la mezcla de PCR .....   | 68  |
| Tabla 2  | Cantidad de glicerol y relación C/N en condiciones no balanceadas descritas en el apartado 12 de resultados .....   | 90  |
| Tabla 3  | Composición de los medios de cultivo descritos en el apartado 13 de resultados .....  | 92  |
| Tabla 4  | Composición de glicerol, tartrato amónico y valor del cociente C/N de los experimentos descritos en el apartado 14 de resultados .....                      | 95  |
| Tabla 5  | Datos experimentales referentes a la fisiología del crecimiento encontrados en el experimento descrito en el apartado 15 de resultados .....                | 99  |
| Tabla 6  | Valores de actividad enzimática encontrados en el experimento descrito en el apartado 16 de resultados .....  | 102 |
| Tabla 7  | Condiciones experimentales diseñadas para evaluar las diferencias en la fisiología del crecimiento y la expresión heteróloga entre cultivos FML y FMS ..... | 103 |
| Tabla 8  | Datos de glicerol consumidos, bajo condiciones experimentales del apartado 17.1.1. ....   | 104 |
| Tabla 9  | Datos de glicerol consumidos, bajo condiciones experimentales del apartado 17.1.2. ....   | 105 |
| Tabla 10 | Datos de glicerol consumidos, bajo condiciones experimentales del apartado 17.1.3. ....   | 107 |
| Tabla 11 | Datos de glicerol consumidos, bajo condiciones experimentales del apartado 17.2.1. ....   | 108 |
| Tabla 12 | Datos de glicerol consumidos, bajo condiciones experimentales del apartado 17.2.2. ....   | 109 |
| Tabla 13 | Datos de glicerol consumidos, bajo condiciones experimentales del apartado 17.2.3. ....   | 111 |
| Tabla 14 | Datos de glicerol consumidos, bajo condiciones experimentales del apartado 17.3.1. ....   | 112 |
| Tabla 15 | Datos de glicerol consumidos, bajo condiciones experimentales del apartado 17.3.2. ....   | 113 |

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| Tabla 16 | Datos de glicerol consumidos, bajo condiciones experimentales del apartado 17.3.3. ....         | 115 |
| Tabla 17 | Valores de los coeficientes de rendimiento encontrados ( $U L^{-1}$ por gramo de biomasa). .... | 122 |
| Tabla 18 | Coefficientes de rendimiento encontrados (g biomasa incorporado/ g biomasa generado). ....      | 125 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 1   | Metabolismo del glicerol en levaduras .....  | 7  |
| Figura 2   | Mapa metabólico parcial de <i>P. pastoris</i> . .....  | 9  |
| Figura 3   | Morfología de los peroxisomas creciendo en diferentes medios. ....   | 12 |
| Figura 4   | Vector de expresión típico empleado para la producción de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i> . .....                        | 16 |
| Figura 5   | Integración del cassette de expresión vía reemplazamiento génico.....  | 18 |
| Figura 6   | Inserción génica del cassette de expresión en <i>AOXI</i> . .....  | 19 |
| Figura 7   | Inserción génica del cassette de expresión en el <i>locus his 4</i> . ....   | 20 |
| Figura 8   | Ilustración que muestra la estructura terciaria de una lacasa típica de <i>Trametes versicolor</i> . .....                             | 38 |
| Figura 9   | Representación esquemática de una molécula de ABTS .....   | 39 |
| Figura 10  | Dendrograma que muestra la diversidad genética de las lacasas de origen fúngico. ....  | 45 |
| Figura 11  | Esquema que muestra la estrategia seguida tras la transformación con el plásmido pPIC9Lac. ....  | 60 |
| Figura 12  | Representación de los vectores utilizados. ....  | 62 |
| Figura 13  | Relación matemática que asigna las cantidades molares correspondientes a cada componente de la reacción de ligación. ....              | 63 |
| Figura 14  | Esquema que muestra la estrategia seguida en la construcción del vector pPIC9Lac. ....   | 64 |
| Figura 15  | Estrategia general para la construcción de las cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> . ....  | 72 |
| Figura 16  | Fragmentos liberados del vector pPFL26 mediante la reacción de restricción <i>NotI</i> y <i>HindIII</i> . ....                         | 75 |
| Figura 17  | Fragmentos liberados del vector pGEMLac mediante la reacción de restricción <i>EcoRI</i> . ....  | 75 |
| Figura 18  | Amplificaciones sobre el vector pGEMLac. ....  | 77 |
| Figura 19  | Modelo teórico de la reacción de restricción para el fragmento <i>FI</i> .....   | 78 |
| Figura 20a | Fragmentos liberados del vector Topo <i>FI</i> mediante la utilización del enzima <i>XhoI</i> . ....                                   | 79 |
| Figura 20b | Fragmentos liberados del vector Topo <i>FI</i> mediante la utilización de las enzimas de restricción <i>XhoI</i> y <i>SacII</i> . .... | 79 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 21  | Modelo teórico previsto para la reacción de restricción del vector Topo <i>FII</i> . .....                                   | 80 |
| Figura 22a | Fragmentos liberados del vector Topo <i>FII</i> mediante la utilización del enzima <i>XhoI</i> . .....                       | 80 |
| Figura 22b | Fragmentos liberados del vector Topo <i>FII</i> mediante las enzimas de restricción <i>SacII</i> y <i>AvrII</i> . .....      | 80 |
| Figura 23  | Fragmentos amplificados, mediante PCR, en el DNA plasmídico de los vectores Topo <i>FI</i> y Topo <i>FII</i> .....           | 81 |
| Figura 24  | Fragmentos incluidos en la reacción de ligación para la construcción del plásmido pPIC9lac. ....                             | 82 |
| Figura 25  | Fragmentos liberados del vector pPIC9Lac mediante combinaciones enzimáticas para la restricción. ....                        | 83 |
| Figura 26  | Fragmentos amplificados, mediante PCR, sobre el plásmido pPIC9Lac con varios pares de oligonucleótidos. ....                 | 84 |
| Figura 27  | Fragmentos amplificados mediante PCR sobre el DNAg de las cepas GS115 de <i>P. pastoris</i> . ....                           | 85 |
| Figura 28  | Fragmentos amplificados mediante PCR sobre el DNAg de las cepas KM71 de <i>P. pastoris</i> . ....                            | 86 |
| Figura 29  | Placas de Petri His <sup>-</sup> con ABTS y CuSO <sub>4</sub> para la selección de los transformantes. ....                  | 87 |
| Figura 30  | Gel de poliacrilamida donde se muestran proteínas presentes en el sobrenadante de la cepa GS115. ....                        | 88 |
| Figura 31  | Representación gráfica de la evolución del crecimiento de la biomasa en FML, condiciones descritas en el apartado 12.1. .... | 89 |
| Figura 32  | Evolución del pH en condiciones C/N no balanceadas. En condiciones experimentales descritas en el apartado 12.1. ....        | 90 |
| Figura 33  | Representación gráfica de la evolución del crecimiento de la biomasa en FMS, condiciones descritas en el apartado 12.2. .... | 91 |
| Figura 34  | Evolución del pH en condiciones C/N no balanceadas. En condiciones experimentales descritas en el apartado 12.2. ....        | 91 |
| Figura 35  | Valores de $\mu$ a diferentes valores de C/N, condiciones experimentales descritas en los apartados 12.1. y 12.2. ....       | 92 |
| Figura 36  | Evaluación del efecto de la fuente de nitrógeno en el crecimiento y la evolución del pH en FML y FMS. ....                   | 93 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| Figura 37a | Representación gráfica de la evolución del crecimiento de la biomasa en FML, condiciones descritas en el apartado 14. ....   | 94  |
| Figura 37b | Evolución del pH en condiciones C/N balanceadas, condiciones experimentales descritas en el apartado 14. ....  | 95  |
| Figura 37c | Representación gráfica de la evolución del crecimiento de la biomasa en FMS, condiciones descritas en el apartado 14. ....   | 95  |
| Figura 37d | Evolución del pH en condiciones C/N balanceadas, condiciones experimentales descritas en el apartado 14. ....  | 96  |
| Figura 38a | Cinética correspondiente al crecimiento de la cepa GS115 clon 55 en cultivos FML. (Condiciones descritas en apartado 15) 90,4 g L <sup>-1</sup> glicerol 7.9 g L <sup>-1</sup> MetOH. Y valores de pH .... | 97  |
| Figura 38b | Cinética correspondiente al crecimiento de la cepa GS115 clon 55 en cultivos FMS. (Condiciones descritas en apartado 15) 90,4 g L <sup>-1</sup> glicerol 7.9 g L <sup>-1</sup> MetOH. Y valores de pH .... | 97  |
| Figura 39a | Cinética correspondiente al crecimiento de la cepa GS115 clon 55 en cultivos FML. (Condiciones descritas en apartado 15) 90,4 g L <sup>-1</sup> glicerol y valores de pH. ....                             | 98  |
| Figura 39b | Cinética correspondiente al crecimiento de la cepa GS115 clon 55 en cultivos FMS. (Condiciones descritas en apartado 15) 90,4 g L <sup>-1</sup> glicerol y valores de pH. ....                             | 99  |
| Figura 40  | Evaluación del efecto de la adición de metanol en ausencia de glicerol, en estadios posteriores a la fase exponencial de crecimiento, sobre la biomasa y la actividad enzimática. ....                     | 101 |
| Figura 41  | Datos de biomasa y pH obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.1.1. ....   | 104 |
| Figura 42  | Datos de biomasa y pH obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.1.2. ....   | 105 |
| Figura 43  | Actividad enzimática medida en U L <sup>-1</sup> , condiciones descritas en el apartado 17.1.2. ....   | 106 |
| Figura 44  | Datos de biomasa y pH obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.1.3. ....   | 106 |
| Figura 45  | Actividad enzimática medida en U L <sup>-1</sup> , condiciones descritas en el apartado 17.1.3. ....   | 107 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Figura 46 | Datos de biomasa y pH obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.2.1. ....  | 108 |
| Figura 47 | Datos de biomasa y pH obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.2.2. ....  | 109 |
| Figura 48 | Actividad enzimática medida en $U L^{-1}$ , condiciones descritas en el apartado 17.2.2. ....   | 110 |
| Figura 49 | Datos de biomasa y pH obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.2.3. ....  | 110 |
| Figura 50 | Actividad enzimática medida en $U L^{-1}$ , condiciones descritas en el apartado 17.2.3. ....   | 111 |
| Figura 51 | Datos de biomasa y pH obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.3.1. ....  | 112 |
| Figura 52 | Datos de biomasa y pH obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.3.2. ....  | 113 |
| Figura 53 | Actividad enzimática medida en $U L^{-1}$ , condiciones descritas en el apartado 17.3.2. ....   | 114 |
| Figura 54 | Datos de biomasa y pH obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.3.3. ....  | 115 |
| Figura 55 | Actividad enzimática medida en $U L^{-1}$ , condiciones descritas en el apartado 17.3.3. ....   | 116 |
| Figura 56 | Superficie de respuesta. Efecto de la concentración inicial de glicerol y la concentración de metanol sobre el valor de biomasa máxima obtenido en FML. ....              | 117 |
| Figura 57 | Superficie de respuesta. Efecto de la concentración inicial de glicerol y la concentración de metanol sobre el valor de biomasa máxima obtenido en FMS. ....              | 117 |
| Figura 58 | Superficie de respuesta. Efecto de la concentración inicial de glicerol y la concentración de metanol sobre el valor de actividad enzimática máxima obtenido en FML. .... | 118 |
| Figura 59 | Superficie de respuesta. Efecto de la concentración inicial de glicerol y la concentración de metanol sobre el valor de actividad enzimática máxima obtenido en FMS. .... | 119 |
| Figura 60 | Superficie de respuesta. Efecto de la concentración de glicerol y la concentración de metanol sobre $\mu$ en cultivos FML. ....   | 120 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Figura 61 | Superficie de respuesta. Efecto de la concentración de glicerol y la concentración de metanol sobre $\mu$ en cultivos FMS.....                  | 120 |
| Figura 62 | Curvas de biomasa y pH generadas bajo las condiciones descritas en el apartado 19 (7.9 g L <sup>-1</sup> de metanol). ....                      | 122 |
| Figura 63 | Curvas de biomasa y pH generadas bajo las condiciones descritas en el apartado 19. (31.6 g L <sup>-1</sup> de metanol). ....                    | 123 |
| Figura 64 | Valores de actividad enzimática encontrados bajo las condiciones experimentales descritas en el apartado 19. ....                               | 123 |
| Figura 65 | Análisis comparativo de la capacidad de atenuación de la toxicidad generada por altas concentraciones de metanol sobre cultivos FML y FMS. .... | 124 |
| Figura 66 | Conformación de los agregados celulares generados sobre FMS en etapas más tempranas del cultivo (24 h) ....                                     | 126 |
| Figura 67 | Configuración de los agregados celulares a las 96 h de cultivo sobre PUF, para fermentaciones FMS. (Aumento 100x) ....                          | 127 |
| Figura 68 | Configuración de los agregados celulares a las 96 h de cultivo sobre PUF, para fermentaciones FMS. (Aumento 10x). ....                          | 128 |
| Figura 69 | Conformación de los agregados celulares (FML) a baja densidad (24 h), igualmente sobre medio BMG. ....  | 129 |
| Figura 70 | Configuración del cultivo en medio líquido a altas densidades celulares (96 h), sobre medio BMG.....  | 129 |

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

ABTS: 2,2' azinobis (3-etil-benzotiazonil-6-sulfonato).

AEDT: ácido etilenaminotetracético.

AMPc: monofosfato cíclico de adenosina.

*AOX*: alcohol oxidasa.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero

ATP: adenosín trifosfato.

A +T: contenido en adeninas y guaninas.

BMG/BMM: buffered minimal glycerol or methanol medium.

BSA: seroalbúmina bovina.

cDNA: ADN complementario.

C/N: relación o cociente carbono – nitrógeno.

DAP: diaminopeptidasa.

DAS1: dihidroxiacetona sintetasa.

DHAP: dihidroxi acetona fosfato.

DNA: ácido dexosirribonucleico.

dNTP: dexosirribonucleótido.

FAD: flavín adenín dinucleótido.

FDA: food and drug administration.

FML: fermentación en medio líquido.

FMS: fermentación en medio sólido.

GAP: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

G+C: contenido en guanina y citosina.

gDNA: DNA genómico

G3P: glicerol 3-fosfato.

GRAS: generally recognized as safe.

GTP: guanidín trifosfato.

HPLC: high performance liquid chromatography.

kb: kilobase.

*LAC*: lacasa.

*lcc*: lacasa.

LB: Luria- Bertani Medium.



MCOs: proteínas multicobre oxidasas.  
mDNA: DNA mitocondrial.  
Mut<sup>s</sup>: methanol utilization slow.  
Mut<sup>+</sup>: methanol utilization positive.  
Mut<sup>-</sup>: methanol utilization negative.  
NADH: nicotínamida adenín dinucleótido.  
nDNA: DNA nuclear.  
ORF: open reading frame.  
pb: pares de bases.  
PCR: polymerase chain reaction.  
PDA: potato dextrose agar.  
PDB: potato dextrose broth.  
PTS: peroxisomal targeting signals.  
p/v: peso volumen.  
RDB: regeneration dextrose base.  
rpm: revoluciones por minuto.  
SCP: proteína celular simple.  
SDS: sodium dodecyl sulfate.  
SUC2: secuencia señal de levadura.  
TAP: péptido fuerte anticoagulante.  
TCA: ácidos tricarbónicos.  
TG: tiempo en glicerol.  
TIMP-1: inhibidor de metaloproteínasas de matriz de tejido 1.  
TNF: factor de necrosis tumoral.  
UV: ultravioleta.  
v/v: volumen volumen.  
YNB: yeast nitrogen base.  
YPD: yeast extract peptone dextrose.

## INTRODUCCIÓN

## 1. ASPECTOS GENERALES DEL GÉNERO *Pichia*

Las levaduras metilotróficas fueron aisladas por primera vez en 1969 y su atractivo principal fue la producción de proteína celular simple (SCP) (Ogata y col., 1969 Spencer, y col., 2002,). El género *Pichia* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*, orden *Saccharomycetales*, clase *Saccharomycetes*, phylum *Ascomycota*, reino *Fungi*. Esta levadura presenta reproducción sexual con producción de ascosporas, (4 esporas por asca con baja viabilidad). En medio sólido forma colonias no filamentosas de color blanco o crema. Al microscopio se pueden observar múltiples yemas.

El género *Pichia* posee muchas especies, algunas asociadas con insectos y que se han aislado de lodos fundidos y galerías de coleópteros. Otras especies son cactofílicas, habitantes específicos de cactus. Por otro lado se ha encontrado formando asociaciones con *Drosophila*; estas formas asociadas con insectos presentan ascosporas en forma de sombrero o hemiesférica (saturno-esporas). Algunas especies de este género pueden ser encontradas en diversos ambientes, incluyendo salmuera y fluidos de curtiembres. Las especies que presentan saturno-esporas se han reasignado a los géneros *Williopsis* y *Saturnispora*, y aquellas especies con esporas esféricas planas al género *Debaryomyces*. Muy cercano al género *Yamadazyma*, el género *Hyphopichia* es considerado un sinónimo del género *Pichia* (Sreekrishna y Kropp., 1996). Dentro del género *Pichia* se encuentran especies tanto fermentativas como no fermentativas, y se han encontrado varios tipos de coenzimas Q (CoQ7, CoQ8 y CoQ9) como intermediarias en la cadena de transporte electrónico, lo que muestra que el género es muy heterogéneo. Sin embargo, algunas de sus especies se han transferido de forma prematura al género *Yamadazyma*. Hasta 1996 éste género había sido enriquecido con la transferencia de algunas especies del género *Hansenula*.

### **1.1. *Pichia pastoris* como hospedero para la producción de proteínas recombinantes**

La biotecnología de proteínas está implicada en la producción y aislamiento de proteínas específicas a partir de diversas fuentes naturales, tales como plantas, animales o microorganismos, para su posterior empleo en diversas aplicaciones. La tecnología del ADN recombinante ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de la biotecnología de proteínas, ya que gracias a ella ha sido posible producir grandes cantidades de enzimas, muchas de las cuales se encuentran en concentraciones muy bajas en su ambiente nativo. Hoy en día, (Peng Wu y col., 2008) se ofrecen en el mercado internacional toda una variedad de proteínas de origen recombinante con un amplio abanico de aplicaciones, incrementándose rápidamente la lista de estos productos. Esto ha llegado a constituir toda una revolución en el mercado biotecnológico, y a la vez ha impulsado la investigación en este campo (Walsh y Headon, 1995).

Para la producción de proteínas recombinantes, se emplean actualmente una gran variedad de hospederos, que van desde organismos tales como bacterias, hongos, levaduras, y líneas celulares de mamíferos o de insectos hasta organismos más complejos, como el empleo de animales y plantas transgénicas. Dentro de las bacterias, *Escherichia coli* (Chan Woo Cheng y col., 2009) ha sido la más empleada para estos fines aunque también se han utilizado *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., etc (Walsh y Headon, 1995; Wolfgang Schumann, 2006). Los sistemas de expresión de proteínas recombinantes basados en levaduras han demostrado ser una fuente eficiente y económicamente viable de proteínas de eucariotas superiores de interés industrial y/o académico (Buckholz y Gleeson, 1991; Romanos y col., 1992; Berend Tolner y col., 2006; Papakonstantinou y col., 2009). Además, las levaduras ofrecen un ambiente apto

para el plegamiento de proteínas eucarióticas, llevando a cabo algunas modificaciones postraduccionales, y pueden secretar las proteínas recombinantes al medio de cultivo. Las levaduras mantienen las ventajas de los microorganismos, al ser unicelulares, de fácil manipulación y rápido crecimiento. Sin embargo, su organización celular es eucariótica, permitiendo la realización de procesos de expresión y maduración característicos de células animales y vegetales (Buckholz y Gleeson, 1991; Romanos y col., 1992).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es actualmente el sistema eucariota mejor caracterizado desde el punto de vista de la biología molecular y la fisiología. Su genoma se encuentra totalmente secuenciado y está considerado como organismo GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) americana. Por estos motivos, muchos de los sistemas de expresión desarrollados para la producción de proteínas heterólogas están basados en *S. cerevisiae*. Por ello no representó ninguna sorpresa que la primera vacuna recombinante comercializada, la vacuna contra el virus de la Hepatitis B, se produjera en *S. cerevisiae*. No obstante, las limitaciones de este microorganismo se han puesto de manifiesto al aumentar de manera significativa el número de sistemas de expresión basados en levaduras no convencionales (no *Saccharomyces*), los cuales exhiben más ventajas como productores de ciertas proteínas heterólogas. Entre estos nuevos microorganismos hospederos se incluyen *Hansenula polymorpha*, *P. pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis*, los cuales constituyen la base de diversos procesos desarrollados a escala industrial (Buckholz y Gleeson, 1991; Roriumos y col., 1992; Walsh y Headon, 1995; S. Raimondi y col., 2008).

El sistema de expresión basado en la levadura metilotrófica *P. pastoris* ha ganado aceptación como hospedero para la producción de proteínas recombinantes

(Buckholz y Gleeson, 1991; Romanos y col., 1992; Cregg y col., 1993; Sreekrishna y col., 1993; Romanos, 1995; Sreekrishna y Kropp, 1996; Sreekrishna y col., 1997; Higgins y Cregg, 1998; Escamilla- Treviño y col., 1999; Cereghino y Cregg, 2000; Papakonstantinou y col., 2009). Algunos reportes relativamente recientes revelan que se han publicado más de 400 artículos relacionados con la producción de alguna proteína heteróloga en *P. pastoris* (Higgins y Cregg, 1998; Escamilla- Treviño y col., 1999; Cereghino y Cregg, 2000; Pingzuo Li y col., 2007).

La levadura *P. pastoris* comparte las ventajas de la fácil manipulación genética y bioquímica con *S. cerevisiae*, pero supera a ésta en 10 a 100 veces en los niveles de producción de proteínas heterólogas (Romanos, 1995; Sreekrishna y Kropp, 1996; Sreekrishna y col., 1997; Higgins y Cregg, 1998; Escamilla- Treviño y col., 1999; Cereghino y Cregg, 2000). Ambas levaduras se han utilizado en la producción de algunas proteínas (factor de crecimiento epidérmico de ratón, albúmina sérica humana, inmunoglobulina F-I humana, etc.) y en todos los casos la productividad de *P. pastoris* ha sido muy superior a la de *S. cerevisiae* (Buckholz y Gleeson, 1991; Romanos, 1995; Rasa Petraitytė y col., 2007).

A principios de los años 80 del siglo pasado, Phillips Petroleum Co. Se asoció con una compañía biotecnológica para el desarrollo de un sistema de expresión de genes heterólogos en *P. pastoris*. De esta manera, con la existencia de metodologías de fermentación bien establecidas, junto con el aislamiento de promotores fuertemente inducidos y regulados por metanol así como el desarrollo de herramientas de manipulación genética para *P. pastoris*, se sentaron las bases para el empleo de este organismo hospedero para la producción de proteínas heterólogas como alternativa a *S. cerevisiae*. Desde 1990, Phillips Petroleum Co. permitió el empleo de esta tecnología a universidades y organizaciones sin ánimo de lucro para su uso no comercial.

La levadura *P. pastoris* tiene la capacidad de crecer en metanol como única fuente de carbono, por lo que se considera metilotrófica. La habilidad de las levaduras para utilizar metanol como única fuente de carbono para el crecimiento ha sido determinada para géneros tales como *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis* y *Pichia* (Lee y Komagata, 1980; Gleeson y Sudbery, 1988; Wegner, 1990). La ruta metabólica para la conversión del metanol a dióxido de carbono y agua involucra a las enzimas alcohol oxidasa, catalasa, formaldehído deshidrogenasa, S-formil-glutación hidrolasa y formiato deshidrogenasa (Veenhuis y col., 1983b; Ellis y col., 1985) (Fig 2). En la primera etapa del metabolismo del metanol, éste se oxida a formaldehído, por medio de la enzima alcohol oxidasa, generándose peróxido de hidrogeno. La alcohol oxidasa tiene poca afinidad por el O<sub>2</sub> lo que es compensado con la síntesis de grandes cantidades de la enzima, llegando a representar el 35% de la proteína celular total (Romanos, 1995; Sreekrishna y Kropp, 1996; Sreekrishna y col., 1997; Higgins y Cregg, 1998; Escamilla-Treviño y col., 1999; Cereghino y Cregg, 2000). Existen dos genes en *P. pastoris* que codifican para la alcohol oxidasa, los genes *AOX1* y *AOX2*. Las proteínas producto de ambos genes tienen una similitud del 97% y poseen aproximadamente la misma actividad específica. Sin embargo, la gran mayoría de los transcritos provienen del gen *AOX1*. Por lo tanto, la alcohol oxidasa que es responsable de casi toda la degradación del metanol es la codificada por *AOX1* (Ellis y col., 1985; Tschopp y col., 1987a ; Cregg y col., 1989; Higgins y Cregg, 1998).

La expresión del gen *AOX1* está regulada de modo que la enzima no se sintetiza en presencia de otra fuente de carbono, sea ésta etanol, glicerol o glucosa, pero su expresión se estimula cuando la fuente de carbono es metanol, debido a la activación del promotor de dicho gen por este sustrato (Tschopp y col., 1987b; Romanos, 1995; Sreekrishna y Kropp, 1996; Sreekrishna y col., 1997; Higgins y Cregg, 1998;

Escamilla-Treviño y col., 1999; Cereghino y Cregg, 2000). Este promotor es el elemento regulatorio utilizado para dirigir la biosíntesis de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. Con base en las características de este proceso metabólico, se ha desarrollado un sistema de producción de proteínas recombinantes en el cual un vector, que porta el gen heterólogo bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa 1, se introduce en las células. Posteriormente, por recombinación homóloga, se integra al genoma de la levadura, siendo posible inducir la expresión del gen heterólogo al añadir metanol como única fuente de carbono. Además *P. pastoris* es capaz de utilizar otras fuentes de carbono, como glicerol, y etanol, cuyo metabolismo se describe en las secciones subsiguientes.

### **1.2. Metabolismo del glicerol en *P. pastoris***

El glicerol es un polihidroxi alcohol que puede incorporarse y utilizarse por las levaduras como fuente de carbono y de energía. (Fig. 1) Una vez que el glicerol entra a la célula se fosforila por la glicerol quinasa (E.C.2.7.1.30), para formar glicerol 3-fosfato (G3P). Posteriormente ocurre la oxidación del G3P a DHAP, debida a la acción de la enzima, dependiente de FAD glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (E.C.1.1.99.5). Finalmente, la DHAP continúa la segunda fase de la vía glicolítica y se obtiene el ácido pirúvico. El piruvato es posteriormente oxidado a acetil-CoA y alimenta el ciclo de los ácidos tricarboxílicos de donde se obtienen GTP, NADH + H<sup>+</sup> y FADH<sub>2</sub>; estos dos últimos serán utilizados posteriormente para generar ATP a través de la cadena de transporte electrónico y fosforilación oxidativa (Fig 1) (Ratledge, 2001; Ren y col., 2003).



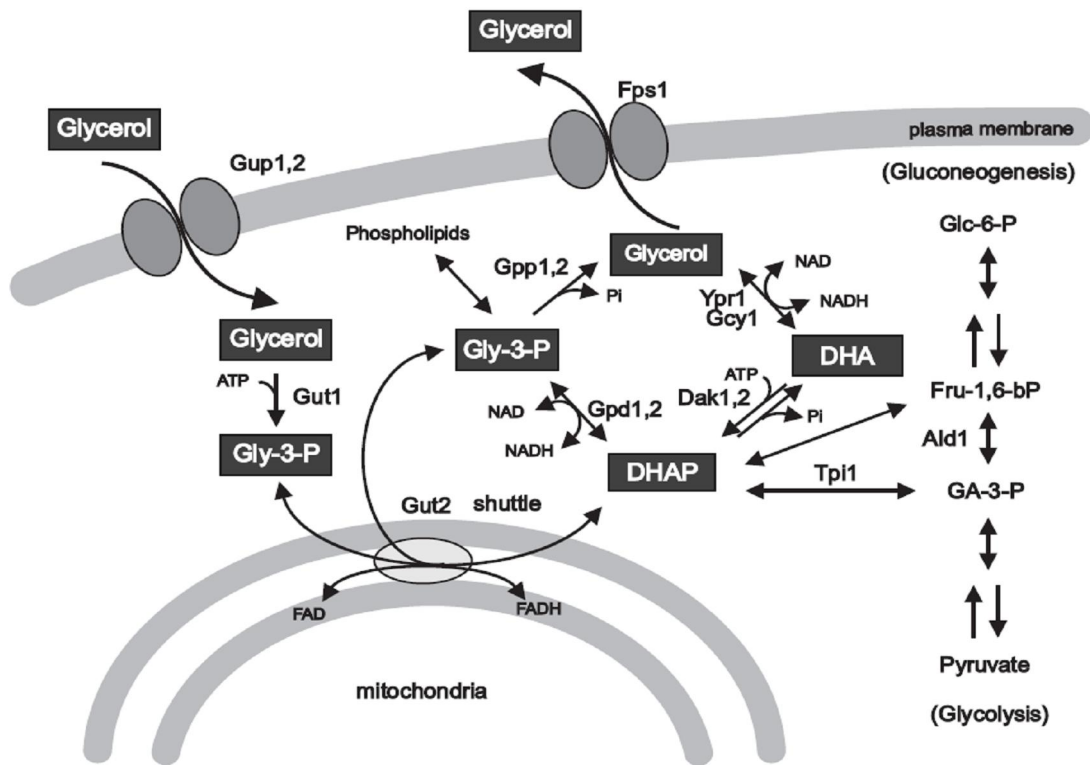


Figura 1. Metabolismo del glicerol en levaduras. Tamas y col., (1999).

### 1.2.1. Transporte del glicerol

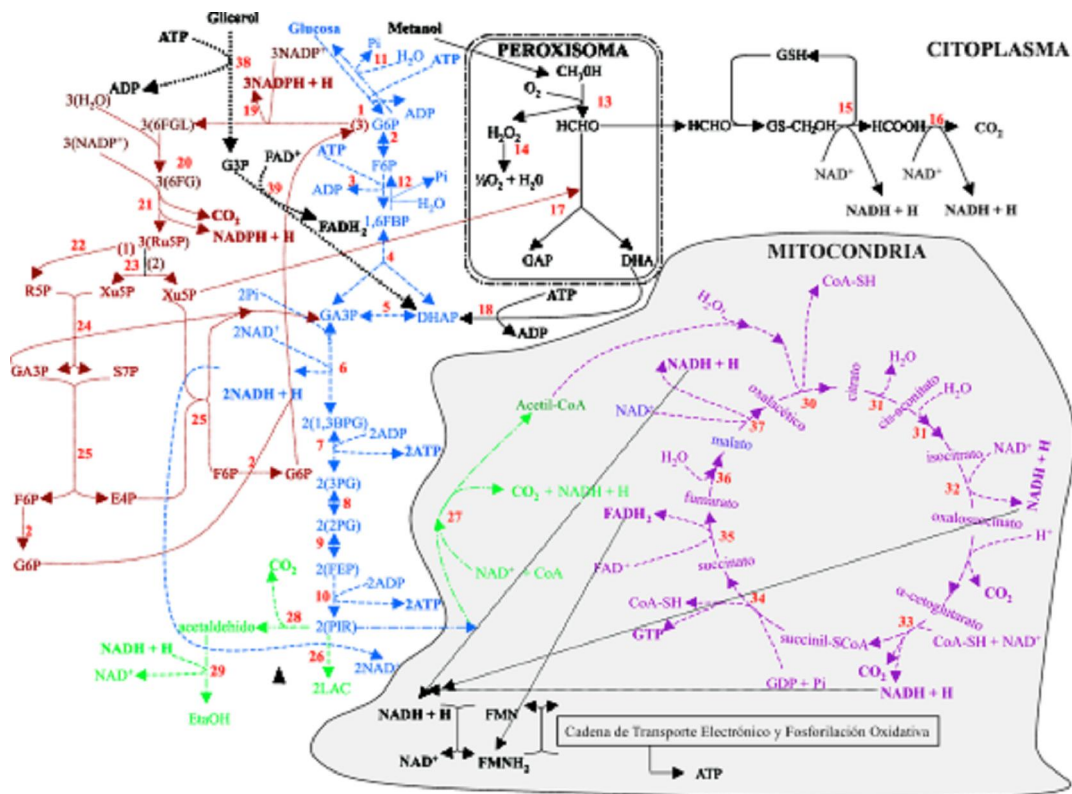
En el género *Pichia* (*P. sorbotophyla*) se ha descrito un sistema de toma activa de glicerol similar al de *S. cerevisiae*. (Lages y Lucas, 1995). En este microorganismo, (*S. cerevisiae*) el glicerol puede penetrar al interior celular a través de tres mecanismos i) difusión pasiva, ii) difusión facilitada y iii) transporte activo. La difusión pasiva de glicerol es mensurable, pero baja, y se ha visto que se reduce en condiciones donde las células están creciendo con una alta **osmolaridad**. En otros trabajos se concluye que el estrés osmótico afecta a las propiedades físico-químicas de la membrana plasmática, lo cual podría explicar los cambios en la permeabilidad (Brown, 1974; Sutherland y col., 1997; Gancedo, 1998).

La difusión facilitada está mediada por el canal de glicerol Fps1. Este Fps 1 interviene tanto en la toma de glicerol como en la expulsión, jugando un papel central en la regulación de la concentración intracelular de glicerol (Sutherland y col., 1997,

Tamas y col., 1999). Igualmente, las levaduras poseen un mecanismo involucrado en el transporte facilitado (simporte) con  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$  (Lucas y col., 1990). La proteína homóloga Gup1p y Gup2p median probablemente el transporte activo de glicerol en *S. cerevisiae*. Ambas proteínas contienen varios segmentos transmembrana y Gup1p ha sido localizada en la membrana plasmática. Las células que carecen de esta proteína tienen reducido su crecimiento en medios con glicerol como única fuente de carbono, asimismo también se ha visto una atenuación en el proceso de transporte activo de glicerol (Holst y col., 2000).

### **1.3. Metabolismo del etanol en *P. pastoris***

A partir del piruvato puede dispararse la fermentación alcohólica, lo que depende de la capacidad respiratoria y el ritmo metabólico de la glucólisis (Fig. 2). En este proceso, el piruvato es transformado a acetaldehído por la piruvato descarboxilasa (E.C.4.1.1.1) y éste es reducido para formar etanol, reacción catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.1) (Inan M y Meagher 2001; Ren y col., 2003). Adicionalmente, el etanol puede ser empleado como fuente de carbono y energía, si se restablece la capacidad respiratoria de la levadura. En este caso, el etanol sería transformado hasta acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa y luego a acetato por la acetaldehído deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.10), para que finalmente la acetil-CoA sintasa lo convierta en acetil-CoA (Ren y col., 2003).



**Figura 2.** Mapa metabólico parcial de *P. pastoris*. **números en color rojo:** enzimas que participan en cada vía. **(color azul):** glucólisis y gluconeogénesis en el citoplasma, **1:** hexoquinasa (E.C.2.7.1.1), **2:** glucosa fosfato isomerasa (E.C.5.3.1.9), **3:** 6-fosfofructo quinasa (E.C.2.7.1.11), **4:** fructosa 1,6-bifosfato aldosa (E.C.4.1.2.13), **5:** triosa fosfato isomerasa (E.C.5.3.1.1), **6:** gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (E.C.1.2.1.12), **7:** fosfoglicerato quinasa (E.C.2.7.2.3), **8:** fosfoglicero mutasa (E.C.2.7.5.3), **9:** enolasa (E.C.4.2.1.11), **10:** piruvato quinasa (E.C.2.7.1.40), **11:** glucosa 6-fosfatasa (E.C.3.1.3.9), **12:** fructosa 1,6- bifosfatasa (E.C.3.1.3.11). **(color negro):** degradación de metanol en el peroxisoma, **13:** alcohol oxidasa (E.C.1.1.3.13), **14:** catalasa (E.C. 1.11.1.7), **15:** formaldehído deshidrogenasa (E.C.1.2.1.1), **16:** formato deshidrogenasa (E.C.1.2.1.2), **17:** dihidroxiacetona sintasa (E.C.2.2.1.3), **18:** dihidroxiacetona quinasa (E.C. 2.7.1.29). **(color marrón):** vía de las pentosas fosfato, **19:** glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.49), **20:** lactona hidrolasa (E.C.3.1.1.45), **21:** 6-fosfogluconato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.43), **22:** ribosa fosfato isomerasa (E.C.5.3.1.6), **23:** ribulosa fosfato 3-epimerasa (E.C.5.1.3.1), **24:** transcetolasa (E.C.2.2.1.1), **25:** transaldolasa (E.C. 2.2.1.2). **(color verde):** reacciones no relacionadas directamente con ninguna vía metabólica, **26:** lactato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27), **27:** complejo de la piruvato deshidrogenasa (piruvato deshidrogenasa, dihidrolipoil-transacetilasa y dihidrolipoil-deshidrogenasa), **28:** piruvato descarboxilasa (E.C.4.1.1.1), **29:** alcohol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.1). **(morado):** ciclo de krebs, **30:** citrato sintasa (E.C. 4.1.3.7), **31:** aconitasa (E.C.4.2.1.3), **32:** isocitrato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.41), **33:** a-cetoglutarato deshidrogenasa (E.C.1.2.4.2), **34:** succinil-CoA sintetasa (E.C.6.2.1.4), **35:** succinato deshidrogenasa (E.C.1.3.99.1), **36:** fumarasa (E.C. 4.2.1.2), **37:** malato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37). **(color negro al interior de la mitocondria):** cadena de transporte electrónico. **(color negro discontinua de punto grueso):** Metabolismo del glicerol, **38:** glicerol quinasa (E.C.2.7.1.30), **39:** glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (E.C.1.1.99.5). (Raúl A y col., 2005).

#### 1.4. Represión por carbono

En sentido general, la represión por carbono está mediada por la concentración intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), concentración que es inversamente proporcional a la concentración de glucosa en el medio de cultivo. Cuando la célula crece en presencia de glucosa el nivel intracelular de AMPC es bajo, a causa de que la glucosa inhibe la actividad adenilato ciclasa (E.C.4.6.1.1). Cuando la glucosa se consume totalmente, aumenta rápidamente la concentración de AMPC y forma un complejo con la proteína receptora de AMPC, complejo que actúa sobre el promotor *AOXI*, induciendo la utilización de otras fuentes de carbono (Demain y Davies., 1996).

### **1.5. Inactivación por catabolito**

El crecimiento de las levaduras metilotróficas en presencia de metanol como única fuente de carbono y energía trae como consecuencia la biogénesis de los peroxisomas. Cuando las células cultivadas en metanol se transfirieron a medios de cultivos que contienen fuentes de carbono diferentes, como glucosa o etanol, los peroxisomas desaparecen rápidamente como consecuencia de una degradación activa, que involucra la degradación proteolítica de los mismos (Veenhuis y col., 1978; Murray y col., 1990). Algunos estudios realizados por Murray y col (1990), mostraron que la desaparición de los peroxisomas en *P. pastoris* después de 24 h de bioconversión de etanol a acetaldehído confirma la inactivación por catabolito de la alcohol oxidasa. De la misma manera, los mencionados autores confirmaron, que la pérdida de los peroxisomas en células incubadas durante 48 h en tampón fosfato en presencia de acetaldehído y O<sub>2</sub> es causada por el acetaldehído. Se cree que la presencia de acetaldehído genera la necesidad de un metabolismo aeróbico.

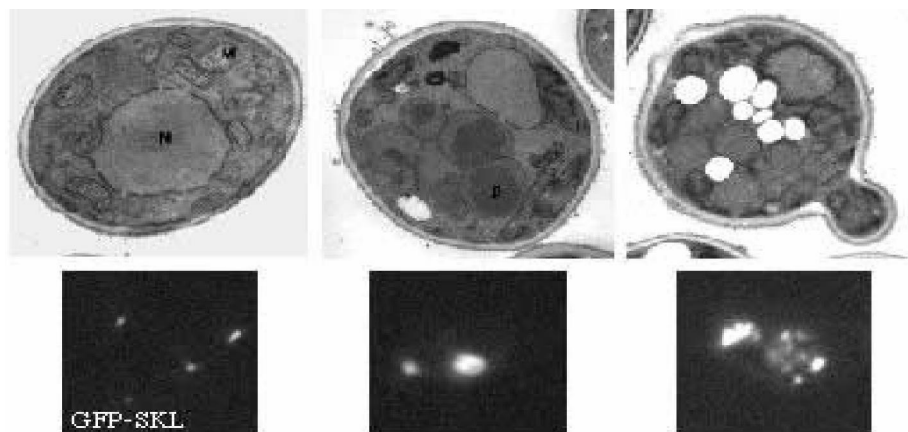
El papel del O<sub>2</sub> hasta 1990 no era muy claro; sin embargo, las conclusiones de los autores estaban basadas en observaciones realizadas en *H. polymorpha*,

microorganismo en que se mostró la posibilidad de prevenir la degradación de los peroxisomas cuando se inhibe el metabolismo energético a través de la incubación anaeróbica, por la adición de iones que inhiben la cadena respiratoria o cuando se transfieren las células a medios de cultivos con fuentes de carbono no metabolizables, como la desoxiglucosa (Veenhuis y col., 1983b). También se sugiere que la utilización de células de *P. pastoris* para la bioconversión de etanol a acetaldehído mimetiza la situación en la que células incubadas en presencia de metanol son transferidas a un medio con etanol; bajo estas condiciones los peroxisomas no son requeridos, lo que dispara el inicio de una serie de eventos regulatorios relacionados con la degradación de los peroxisomas y con la proteólisis (autofagia) para generar nuevamente una mezcla de aminoácidos. Un aumento en la concentración de AMPc ocurre cuando aparecen las primeras moléculas de acetaldehído en presencia de O<sub>2</sub>, lo que activa las proteínas dependientes de quinasas de AMPc. Estas proteínas fosforilan las enzimas del peroxisoma, lo que funciona como una marca o señal para la degradación proteolítica posterior (Murray y col., 1990). En *P. pastoris* la inactivación por catabolito se completa alrededor de 21 h después de que aparezca la primera molécula libre de acetaldehído como resultado de la bioconversión de etanol (Murray y col., 1990).

### **1.6. Los peroxisomas en el metabolismo del metanol**

Los peroxisomas son orgánulos que se encuentran presentes en todas las células eucariotas y se caracterizan por la presencia de enzimas como la catalasa (E.C. 1.11.1.7) y al menos una oxidasa generadora de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Estos orgánulos están constituidos por una membrana simple y pueden variar considerablemente de tamaño, cantidad y contenido enzimático, dependiendo del organismo, el tipo de célula y las condiciones ambientales. Teniendo en cuenta que los peroxisomas no poseen ácidos nucleicos ni ribosomas, todas las proteínas del peroxisoma están codificadas en

el ADN nuclear y deben ser sintetizadas e importadas postraduccionalmente a los peroxisomas, gracias a las secuencias señal necesarias para la importación (peroxisomal targeting signals (PTS)). Hasta 1999, sólo dos clases de PTSs se habían caracterizado. La primera y más común, la PTS1, es una señal compuesta por los tres primeros aminoácidos de la región carboxilo terminal de muchas de las proteínas peroxisomales de animales, plantas y levaduras (SKL); la segunda señal (PTS2), está conformada por la secuencia RLX5H/QL, secuencia que se localiza cerca de la región amino terminal de las proteínas peroxisomales en mamíferos y levaduras. En levaduras, la biogénesis de los peroxisomas (proliferación) es inducida por la utilización de ciertas fuentes de carbono tales como el metanol y el ácido oleico (Subramani, 1993; Johnson y col., 1999) (Fig. 3).



**Figura 3.** Morfología de los peroxisomas creciendo en diferentes medios. En orden de izquierda a derecha, con glucosa, metanol y oleato. (Subramani, 1993)

### **1.7. Características y regulación de la expresión génica de la alcohol oxidasa (*AOX I*) de *Pichia pastoris*.**

La alcohol oxidasa funcional es un homooctámero, en el cual cada subunidad (~74 kDa) contiene un enlace no covalente con nucleótidos de flavina (FAD<sup>+</sup>) como grupo prostético (Veenhuis y col., 1983 (a); Evers y col., 1995; Waterham y col., 1997).

Esta enzima codificada por el gen *AOX1* presenta baja afinidad por el O<sub>2</sub>, afinidad que *P. pastoris* compensa con la producción de grandes cantidades de la misma (Ellis y col., 1985). Hay estudios recientes que mostraron la existencia de un segundo gen funcional para la alcohol oxidasa en *P. pastoris*, (*AOX2*), el cual tiene 90% de similitud en la región codificante con *AOX1*. Sin embargo, esta enzima AOX2 es sólo una pequeña parte de la AOX producida por esta levadura (Ellis y col., 1985; Koutz y col., 1989; Ohi H y col., 1994; Kobayashi K y col., 2000). La regulación de la expresión génica de *AOX* al parecer es mediada por represor, de forma tal que cuando la levadura se incuba en presencia de glucosa o etanol no se sintetiza la enzima (represión por catabolito).

La expresión de las enzimas se induce cuando se incuba en presencia de metanol, (Ellis y col., 1985; Cregg y col., 1989; Gellisen, 2000). Esta regulación implica dos pasos: un mecanismo represión/desrepresión o apagado/encendido (on-off.), además de un mecanismo de inducción. La desrepresión de *AOX1* (en ausencia de una fuente de carbono como glucosa, etanol o acetato) no es suficiente para que se exprese la enzima, aún en niveles basales. Se requiere además la presencia del agente inductor (metanol) para obtener niveles detectables de *AOX* (Romanos y col., 1992).

La pérdida del *AOX1* significa la pérdida de la mayor parte de la actividad alcohol oxidasa (~80%) y resulta en el fenotipo conocido como Mut<sup>s</sup> (utilización lenta del metanol y crecimiento pobre). El fenotipo Mut<sup>+</sup> es el fenotipo nativo y le permite a las células crecer en medio con metanol (Cregg y col., 1985; Vedvick y Col., 1991; Romanos y col., 1992). Algunos estudios realizados con *H. polymorpha* han demostrado la presencia de monómeros inactivos de AOX en el citosol, y que estos son exportados al peroxisoma (dependiendo de las PTS) donde la proteína es activada (formación del octámero y unión de FAD<sup>+</sup>) (Ozimek y col., 2003). Por otro lado, algunos experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* demuestran que el ensamblaje del octámero activo no es un

proceso espontáneo y que se requiere de ciertos factores de ensamblaje (proteínas auxiliaadoras específicas), entre las que se encuentran factores de unión, factores de ensamblaje y factores de translocación (Distel y col., 1987; Van der Klei y col., 1989). Adicionalmente, estos experimentos sugieren que no es necesario un ambiente ácido como el de la matriz peroxisomal para el ensamblado de la AOX (Van der Klei y col., 1991; Ozimek y col., 2003), estos autores identificaron la proteína piruvato carboxilasa (E.C. 6.4.1.1) como la primera proteína que tiene una función esencial en el ensamblaje de la AOX en levaduras metilotróficas. La piruvato carboxilasa es una enzima anaplerótica (forma intermediarios para el ciclo de Krebs) que alimenta el ciclo de los ácidos tricarboxílicos con oxalacetato obtenido a partir de piruvato. Las levaduras deficientes en esta enzima no pueden crecer en medios mínimos con glucosa, a menos que sean suplementados con aspartato o glutamato. De forma inesperada, se demostró que las cepas de *H. polymorpha* y *P. pastoris* deficientes en esta enzima, son incapaces de crecer en presencia de metanol, independientemente de la presencia de aspartato o glutamato y que esta deficiencia en el crecimiento se debe a un bloqueo severo en el proceso de ensamblaje de la AOX.

Los resultados de Ozimek y col., (2003) fueron convincentes en que la proteína piruvato carboxilasa (no, su actividad enzimática) es necesaria para el ensamblaje de la alcohol oxidasa. Otros estudios (Waterham y col., 1997; Ozimek y col., 2003) han revelado la afinidad de la proteína piruvato carboxilasa *in vitro* y su interacción física con la proteína AOX, sugiriendo que en levaduras metilotróficas la primera de estas proteínas juega un doble papel: por un lado la conocida y bien caracterizada función como enzima anaplerótica y por otro, un papel específico en el proceso de organización y ensamblaje de la alcohol oxidasa, posiblemente mediando la unión de FAD<sup>+</sup> a los monómeros de AOX (Waterham y col., 1997; Ozimek y col., 2003).



## 1.8. Otros promotores para la expresión heteróloga

Aunque el promotor *AOXI* ha sido sucesivamente utilizado para expresar numerosas proteínas de genes foráneos, hay circunstancias en las cuales este promotor no puede ser empleado. Por ejemplo, el uso de metanol para inducir la expresión génica puede no ser apropiado para la producción de productos alimentarios. Además, el metanol es un compuesto inflamable y puede resultar un agente de riesgo al almacenarlo en las grandes cantidades necesarias para fermentaciones a gran escala. Por lo tanto, los promotores que no están inducidos por metanol son atractivos para la expresión de ciertos genes. Uno de los promotores alternativos al promotor *AOXI* de *P. pastoris* es el GAP (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa).

El gen del promotor de *P. pastoris* de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAP) provee una expresión fuerte y constitutiva con glucosa a niveles comparables a como lo hace el promotor *AOXI* (Waterham y col., 1997). La ventaja de usar el promotor GAP es que el metanol en la fermentación no es requerido para la inducción y no es necesario cambiar la fuente de carbono.

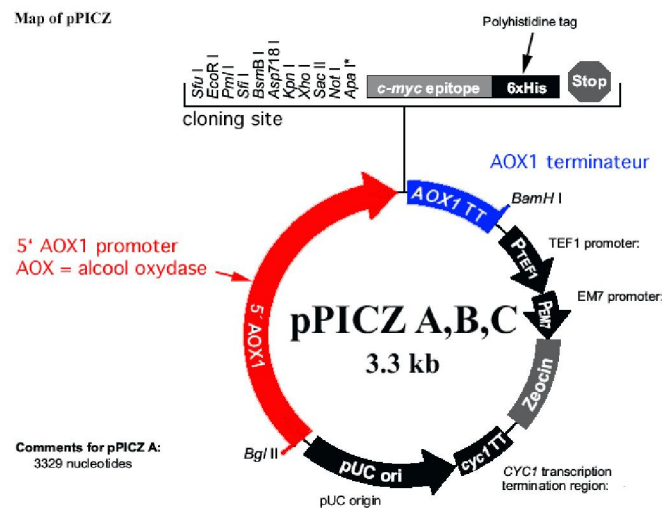
## 1.9. Cepas empleadas para la producción de proteínas heterólogas

Todas las cepas empleadas para la producción de proteínas heterólogas son derivadas de la cepa silvestre *P. pastoris* NRRL Y-11430: GS115 (*his4*), KM71 (*AOXI*, *his4*), PPF1 (*his4*, *arg4*), SMD1163 (*his4*, *pep4*, *prB1*), SMD1165 (*his4*, *prB 1*), y SMD 1168 (*his4*, *pep4*) (Higgins y Cregg, 1998).

La cepa GS115 es la más comúnmente utilizada, tiene un defecto en el gen de la histidinol deshidrogenasa (*His4*) que le impide sintetizar histidina. Los plásmidos de expresión que contienen el gen *HIS4* complementan el defecto del hospedero, de modo que las transformantes se seleccionan por su capacidad para crecer en un medio deficiente de histidina. (Fig. 4) La reversión espontánea de GS115 prototipo  $HIS^+$

ocurre con una frecuencia de  $1 * 10^{-8}$  (Higgins y Cregg, 1998).

La cepa KM71 se emplea para obtener fácilmente clones Mut<sup>S</sup>, por otro lado, la cepa PPF1 se emplea cuando se necesita realizar la transformación con dos plásmidos, mientras que las cepas MD 1168, SMD 1165 y SMD 1163 tienen interrumpidos los genes que codifican para la proteasa A (*PEP4*) y/o proteasa B (*PRB1*), que en algunos casos ha ayudado a disminuir la degradación proteolítica de la proteína recombinante y por lo tanto aumentar su producción (Sreerikshna y col., 1997; Higgins y Cregg, 1998; Cécilia Eydoux y col., 2007).



**Figura. 4.** Vector de expresión empleado para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. (Invitrogen Co. 1996)

## 2. VECTORES DE EXPRESIÓN

Los vectores empleados para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* son plásmidos de integración, es decir, se integran en el genoma de la levadura. Los elementos de un vector característico son los siguientes: promotor y terminador de la transcripción del gen *AOX1* de *P. pastoris* (regiones 5' *AOX1* y 3' *AOX1*, respectivamente), región 3' del mismo gen (3' *AOX1*) y el gen de la histidinol deshidrogenasa *HIS4* de *P. pastoris*, el cual sirve como marcador de selección de cepas de *P. pastoris* mutadas en este gen. Además, para la secreción de la proteína al medio de

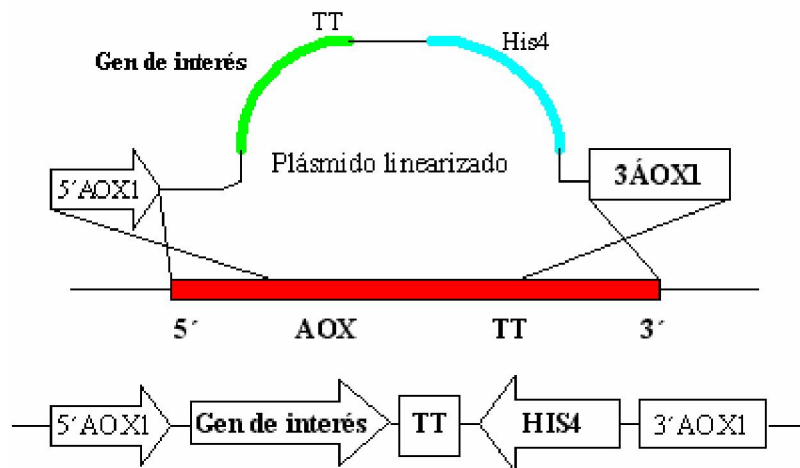
cultivo se utilizan vectores que poseen una secuencia señal tal como la del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, o la secuencia señal de la fosfatasa ácida de *P. pastoris* (*PHO1*).

Finalmente, los vectores también contienen secuencias necesarias tanto para la propagación en *E. coli*, gen de resistencia a ampicilina por ejemplo y el origen de replicación, para dicha bacteria, además de un sitio para la clonación del gen de interés (región de múltiples sitios de restricción) (Higgins y Cregg, 1998; Escamilla-Treviño y col., 1999; Cereghino y Cregg, 2000).

### 2.1. Integración del vector en el genoma de *P. pastoris*

El ADN lineal del vector de expresión puede generar clones estables de *P. pastoris* vía recombinación homóloga entre el ADN transformante y las regiones de similitud dentro del genoma de la levadura (Romanos, 1995; Higgins y Cregg, 1998; Escamilla-Treviño y col., 1999; Cereghino y Cregg, 2000). La integración puede llevarse a cabo de dos formas, dependiendo del sitio de corte del vector antes de llevar a cabo la transformación:

**Reemplazamiento génico:** Este se lleva a cabo mediante un doble entrecruzamiento entre las regiones 5' *AOX1* y 3' *AOX1* del vector con el genoma (Fig. 5) el cual ocasiona clones con eliminación en el gen *AOX1*, cuyo producto cataliza el primer paso para la degradación del metanol.

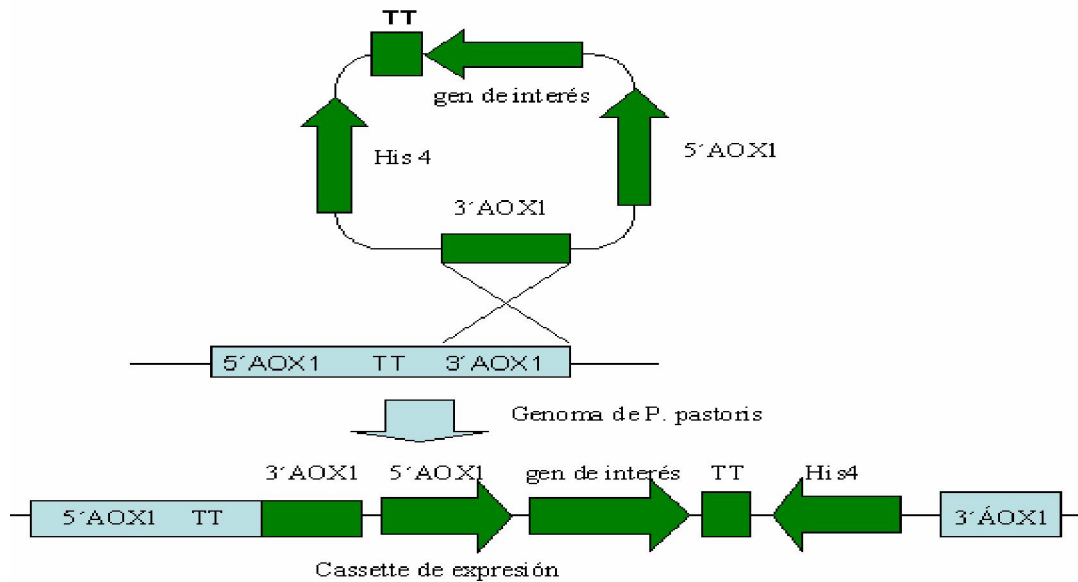


**Figura 5.** Integración del cassette de expresión vía reemplazamiento génico. En cepas *his4* como la GSII5, surge un reemplazamiento génico de un evento de doble entrecruzamiento entre las regiones 5'*AOXI* y 3'*AOXI* del vector con las homólogas del genoma de la levadura. Esto da como resultado la remoción del gen *AOXI*. El fenotipo resultante es His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup>. El resultado neto de este tipo de reemplazamiento génico es la pérdida del *locus AOXI* (Mut<sup>s</sup>) y la ganancia del cassette de expresión. (Matha Guerreo y José M. Viader 200X)

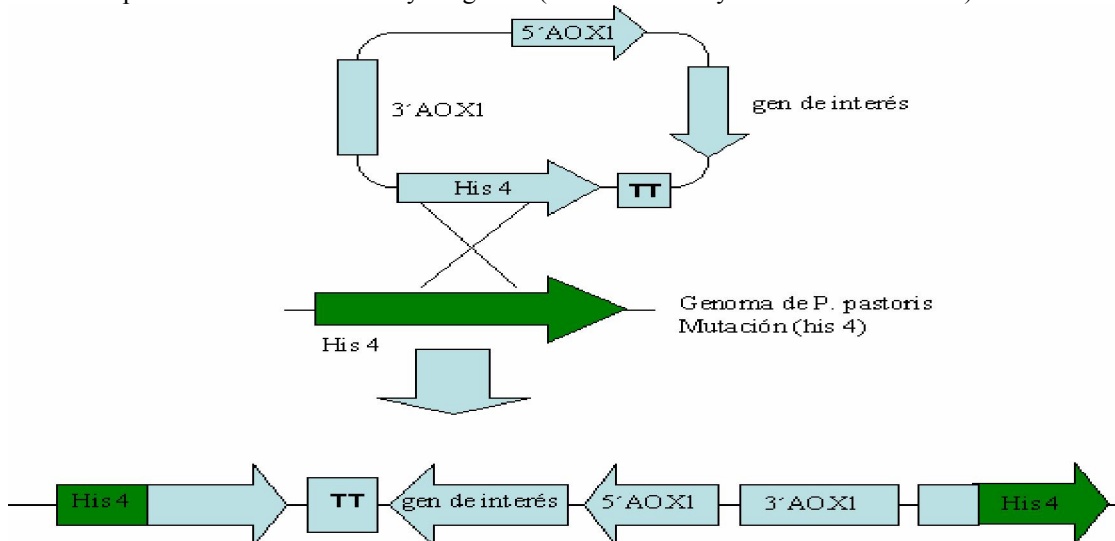
Este tipo de clones crecen lentamente en metanol (Mut<sup>s</sup>: "Methanol utilization slow") comparado con una cepa nativa. Los clones Mut<sup>s</sup> aún conservan el gen *AOX2*, que codifica para una alcohol oxidasa alternativa y que también cataliza el primer paso para la degradación del metanol con una actividad específica similar, aunque que se encuentra en muy bajas cantidades debido a la baja expresión del gen *AOX2*. Este tipo de integración se favorece al transformar células con el plásmido cortado en las regiones 5'*AOXI* y 3'*AOXI*. Aunque se podría esperar sólo clones Mut<sup>s</sup> de una sola copia, un análisis detallado revela que la mayoría de los clones no contienen el vector, por lo que no expresan la proteína y probablemente representen una conversión génica de *HIS4*. Aun así, del 5 al 30% de los clones son verdaderos reemplazamientos (Mut<sup>s</sup>), mientras que las restantes tienen integraciones en *AOXI* o *HIS4* y son Mut<sup>+</sup>. Finalmente, del 1 al 10% de los clones Mut<sup>s</sup> tienen más de 30 copias integradas (Romanos, 1995; Romanos y col., 2008). Para obtener este tipo de clones con alto número de copias es preferible realizar la transformación por la técnica de formación de esferoplastos (Cregg y col., 1985).

**Inserción génica:** Surge de un evento de entrecruzamiento simple entre el *locus AOXI* o *his4* en el genoma y las regiones 5'*AOXI* o *HIS4* en el vector (Fig. 6 y 7), que ocasiona clones que conservan el gen *AOXI* por lo tanto crecen en metanol como única fuente de carbono, a una velocidad igual a la de una cepa nativa de *P. pastoris* y se les denomina Mut<sup>+</sup> ("Methanol utilization positive"). Este tipo de integración se favorece al transformar *P. pastoris* con el plásmido linealizado por cortes en las regiones 5'*AOXI* o

*HIS4*, respectivamente, aunque también puede ocurrir con plásmidos no linearizados o religados, y las mutantes obtenidas son  $Mut^+$ . Casi el 100% de los clones producen la proteína heteróloga y la integración de multicopias ocurre con muy baja frecuencia (Romanos, 1995). Para obtener este tipo de clones se recomienda usar ya sea la técnica de electroporación o la de formación de esferoplastos (Cregg y col., 1985).



**Figura 6.** Inserción génica del cassette de expresión en *AOX1*. Los eventos de inserción génica en el *locus AOX1* surgen de un evento de entrecruzamiento simple entre el *locus AOX1* en el cromosoma y alguna de las tres regiones *AOX1* en el vector (5', 3' ó TT), el resultado es la inserción de una o más copias del vector, mientras que el gen *AOX1* nativo queda intacto ( $Mut^+$ ). Este tipo de eventos también pueden ocurrir con plásmidos no linearizados y religados. (Matha Guerreo y José M. Viader 200X)



**Figura 7.** Inserción génica del cassette de expresión en el, *locus his 4*. En cepas de *P. pastoris his4*, los eventos de inserción en el *locus his4* surgen de un evento de entrecruzamiento simple entre el *locus his4* del cromosoma y el gen *HIS4* del vector, por lo que resulta la inserción de una o más copias del vector. Ya que el *locus AOX1* no está involucrado en este evento recombinación, los clones permanecen con el fenotipo Mut<sup>+</sup> tal y como se ha descrito. (Matha Guerreo y José M. Viader 200X)

### 3. FERMENTACIONES CON *P. pastoris*

A pesar de que se han producido altos niveles de proteínas recombinantes en cultivos de *P. pastoris* realizados en matraces agitados, los niveles de producción en este tipo de cultivos son generalmente bajos en comparación con los niveles obtenidos en fermentadores. Esto es debido, fundamentalmente, a que sólo es posible cultivar el organismo con elevadas densidades celulares (> 100 g L<sup>-1</sup> peso seco ó 500 DO<sub>600</sub>) en el ambiente controlado de un fermentador. Especialmente para el caso de proteínas secretadas al medio de cultivo, la concentración de producto recombinante en el medio es aproximadamente proporcional a la concentración de células en el cultivo.

Por otro lado, el nivel de transcripción del gen heterólogo a través del promotor *AOX1* puede ser 3-5 veces mayor en células de *P. pastoris* alimentadas en fermentador con metanol a velocidades limitantes, en comparación con células cultivadas en presencia de exceso de metanol. Incluso para proteínas expresadas intracelularmente, el porcentaje de la proteína recombinante de una cepa determinada, respecto a las proteínas celulares totales, es mayor en células cultivadas en fermentadores que en matraces agitados. Además, en el metabolismo del metanol se utilizan grandes cantidades de oxígeno y, en consecuencia, la expresión del gen heterólogo se ve afectada negativamente por la limitación de oxígeno. Sólo en el ambiente controlado de un fermentador es posible seguir y ajustar los niveles de oxígeno en el medio de cultivo de forma óptima. En los procesos de fermentación de *P. pastoris* para la producción de proteínas recombinantes bajo el promotor *AOX1*, se realiza una primera etapa de fermentación, en la que se genera gran cantidad de biomasa a través de la utilización de glicerol como fuente de carbono lo cual proporciona un elevado rendimiento de

biomasa/ g de sustrato ( $Y_{x/s}$ ). El glicerol tiene un efecto menos represor sobre el promotor de *AOXI* que otras fuentes de carbono, como la glucosa, por lo que es el sustrato mayormente utilizado durante esta etapa, denominada de alimentación en lote discontinuo o batch.

Posteriormente, se induce la expresión de la proteína recombinante mediante el cambio de fuente de carbono a metanol. El metanol se adiciona realizando una alimentación en lote alimentado *fed batch* y se activa el promotor de *AOXI*, alcanzando altos niveles de expresión del gen *AOXI* (para la posible asimilación del metanol) y del gen heterólogo en cuestión, clonado bajo el control del mismo promotor.

#### **4. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS**

Aunque la producción final de una proteína heteróloga se ve influenciada fundamentalmente por sus propiedades inherentes, la producción puede ser potenciada significativamente por la manipulación de factores que influyen en la expresión genética y la estabilidad de la proteína heteróloga (Escamilla-Treviño y col., 1999). Los factores que influyen en la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* pueden afectar a nivel de la transcripción, traducción o bien en eventos postraduccionales, y estos se describen a continuación: a) Fenotipo de clones en la utilización de metanol ( $Mut^+$  o  $Mut^S$ ), b) Dosis génica, c). Composición de A + T del gen heterólogo, d) Uso de codones del gen heterólogo, e) Estabilidad del ARNm, f) Secuencia 5' no traducida del ARNm, g) Secuencia señal para secreción y h) Estabilidad del producto.

##### **4.1 Fenotipo de clones en la utilización de metanol $Mut^+$ o $Mut^S$ .**

Ambos tipos de clones  $Mut^S$  o  $Mut^+$ , tienen ejemplos de altos niveles de secreción, por lo que lo mejor es probar los dos sistemas al llevar a cabo la producción de una nueva proteína (Romanos, 1995; Sreekrishna y col., 1997; Burkhard Horstkotte y

col., 2008;).

#### **4.2 Dosis génica.**

Aunque existen ejemplos en los cuales una sola copia del cassette de expresión es suficiente para alcanzar niveles máximos de producción, y el incremento deliberado en el número de copias no tiene un efecto significativo en la producción (Creeg y col., 1987; Sreekrishna y col., 1993; Sreekrishna y col., 1997), en la mayoría de los casos el aumento en el número de copias se ha traducido en mayores niveles de producción. Un efecto espectacular en el aumento de niveles de producción, debido al aumento en el número de copias fue observado en la producción del fragmento C de la toxina tetánica, en la pertactina de *Bordetella pertusis*, en el factor de crecimiento epidérmico de ratón y en el factor de necrosis tumoral humano (Sreekrishna y col., 1989; Clare y col., 1991a; Romanos y col., 1991). En algún caso extraño, un incremento en el número de copias tuvo un efecto negativo en el nivel de producción (Thill y col., 1990). Existen varios métodos para seleccionar clones multicopia: realizando hibridaciones con sondas marcadas (Southern blot) o realizando una selección basada en el incremento de la resistencia al antibiótico G418, la cual aumenta en función de la dosis génica, cuando se han empleado vectores de la serie pPIC9K (Thill y col., 1990). Alternativamente, se pueden realizar construcciones multicopia con concatámeros de ADN o empleando vectores especialmente contruidos tales como el pAO856 y pAO815 (Scorer y col., 1994; Sreekrishna y Kropp, 1996) o el pPICZ $\alpha$  (Wei Wang y Xianghua Wen 2009).

#### **4.3. Porcentaje de A + T.**

Los genes que tienen alto contenido de A + T no se transcriben eficientemente, debido a la terminación prematura de la transcripción (Romanos, 1995). En el gen que codifica para HFVgp 120, se identificó una secuencia responsable de la terminación prematura de la transcripción en cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras de este



gen. Cuando esta secuencia fue modificada, aumentando el contenido de G + C, ya no ocurrió la terminación prematura de la transcripción (Scorer y col., 1993). Debido a la existencia de muchas secuencias cortas ricas en A + T que provocan la terminación de la transcripción en forma parcial, una estrategia general ha sido rediseñar ciertos genes para contar con un contenido de A + T entre 30 y 55%, aprovechando la degeneración del código genético para no alterar la secuencia aminoacídica. Usando esta estrategia ha sido posible producir el fragmento C de la toxina tetánica (Clare, 1991 b), Hrv-gpI20 (Scorer y col., 1993) y las toxinas BSPI y BSP2 (Sreekrishna y col., 1993).

#### **4.4. Uso de codones preferenciales.**

En el diseño de genes sintéticos, se recomienda considerar el uso de codones preferenciales, para que se pueda llevar a cabo una óptima producción de la proteína recombinante (Sreekrishna y Kropp, 1996; Sreekrishna y col., 1997). Para ello se ha tomado en cuenta el empleo de codones de cinco genes nativos, altamente expresados en *P. pastoris* cuando se cultiva en metanol, como son los genes de la alcohol oxidasa (*AOX1*, *AOX2*), la dihidroxiacetona sintetasa 1 y 2 (*DAS1*, *DAS2*) y de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAP*). Como codones preferenciales se pueden considerar el primero y segundo codón más empleado para cada aminoácido en estos genes nativos de *P. pastoris*. Sin embargo, hay ejemplos de genes altamente expresados que cuentan con un alto porcentaje de codones no preferenciales (Payne y col., 1995).

#### **4.5. Estabilidad del ARNm.**

Aunque sobre este factor no existe nada descrito en *P. pastoris*, en eucariotas superiores la estabilidad del ARNm ha estado relacionada con el extremo 3' no traducida. Algunos ARNm que codifican para proteínas que tienen un papel importante en el crecimiento celular y diferenciación tienen vidas medias cortas, y muchos de éstos se caracterizan por tener varias secuencias A(U)nA en su extremo 3' no traducido. Por

ejemplo, el factor estimulante de granulocitos humanos contiene siete repeticiones AUUUA, algunas de las cuales están traslapadas; similarmente el factor de necrosis tumoral (TNF) tiene cinco de estas secuencias (Damell y col., 1990). Este factor puede no tener importancia alguna en la producción de proteínas de *P. pastoris*, debido a que generalmente la clonación no incluye las secuencias 3' no traducibles del gen heterólogo, por lo que dependerá específicamente del plásmido empleado.

#### **4.6. Secuencia señal para secreción.**

En la mayoría de los casos, es preferible llevar a cabo la secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo, para de esta manera facilitar los procesos de purificación de la misma. En algunos ejemplos, tales como el de la albúmina sérica humana (Barr y col., 1992), invertasa (Tschopp y col., 1987) y lisozima bovina c2 (Digan y col., 1989), la secuencia señal nativa ha dado resultados favorables. Más recientemente, las secuencias señales de metaloproteinasas o el inhibidor de metaloproteinasas de matriz de tejido 1 (TIMP-1) I han resultado funcionales (Sreekrishna y Kropp, 1996). Sin embargo, durante la producción de alfa amilasa bacteriana la eficiencia de secreción fue mayor empleando una secuencia señal de levadura (SUC2), que la propia secuencia señal nativa (Paifer y col., 1994). En general se ha mencionado que las secuencias señales de levaduras tienden a tener mayor éxito que las secuencias señales nativas (Romanos, 1995). Una secuencia señal que ha sido frecuentemente empleada con éxito es el factor alfa de *S. cerevisiae*, ya que en la mayoría de los casos el procesamiento por la endopeptidasa KEX2 ha sido en el sitio correcto. Ejemplos en los cuales el factor alfa se ha empleado con buenos resultados son la aprotinina (Vedvick y col., 1991), el factor de crecimiento epidermal humano y murino (Siegel y col., 1990; Clare y col., 1991b), un fragmento de 9 kDa de trombomodulina (White y col., 1995), un fragmento de la proteína beta amiloide (Van

Nostrand y col., 1994), el fragmento Fv de anticuerpo de cadena sencilla (Ridder y col., 1995), el anticoagulante antimetastásico de Ghilanten (Brankamp y col., 1995), la alfa galactosidasa de café (Zhu y col., 1995), la enteroquinasa bovina (Vozza y col., 1996), la proteína anticongelante de pez tipo II (Laroche y col., 1994). la lacasa de *Trametes versicolor* (Gelo-Pujic, M y col., 1999; Soden, D. M. y col., 2002) y una fitasa de *B. subtilis* (Guerrero-Olazarán y col., 2007) Cuando se lleva a cabo la fusión con el factor alfa es recomendable retener los espacios Glu-Ala adyacentes al sitio de corte protelítico KEX2. La presencia de los espacios Glu-Ala ayuda a aliviar la interferencia estérica por la proteína fusionada, lo que da por resultado un eficiente rompimiento de la secuencia señal por la proteasa KEX2 (Thill y col., 1990). Los espacios Glu-Ala posteriormente se eliminan por una diaminopeptidasa (DAP) y de esta manera se produce la proteína de interés, libre de residuos adicionales en el extremo N-terminal. Otra secuencia señal que ha sido usada es la de la fosfatasa ácida de *P. pastoris* (PHO1). Sin embargo, sobre esta secuencia señal existe poca evidencia documentada. El receptor de serotonina 5-HT5A fue secretado empleando la secuencia señal de PHO1 o el factor alfa y se obtuvo mayor nivel de secreción con el factor alfa (Weib y col., 1995). Empleando una secuencia señal híbrida PHO1 factor alfa se obtuvo un alto nivel de secreción del péptido anticoagulante (TAP) (Loewen y col., 1997). Con esto se puede concluir que los factores que influyen en la secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo, son la secuencia señal empleada así como el tamaño y complejidad de la proteína de interés.

#### **4.7. Estabilidad del producto.**

Uno de los factores que favorece el alto nivel de acumulación de una proteína recombinante es la estabilidad proteolítica. Las proteínas producidas eficientemente en levaduras carecen de unas secuencias denominadas PEST (Sreekrishna y col., 1997) que

se encuentran en proteínas rápidamente degradadas en eucariotas; tales proteínas se las ha implicado como sustratos favoritos de proteasas activadas por calcio (Rogers y col., 1986). Además, las proteínas producidas en altas concentraciones por levaduras no contienen las secuencias pentapépticas XFXRQ o QRXFX (X = cualquier aminoácido), las cuales son selectivas para la degradación citoplásmica de proteínas por la ruta lisosomal (Dice, 1987).

El problema de inestabilidad proteolítica en el medio ha sido encontrado con varias proteínas secretadas de *P. pastoris*. La estabilidad puede ser mejorada cambiando el pH del medio, el rango de pH con el que se puede experimentar está entre 2.8 y 6.5. La adición de casaminoácidos, peptona o EDTA 5 mM también puede mejorar la estabilidad del producto (Romanos, 1995; Sreekrishna y col., 1997; Pingzuo Li y col., 2007), o bien puede ser potenciada usando cepas deficientes en proteasas, tales como SMD 1168 (*his4, pep4*), SMD1165 (*his4, prbl*) y SMD1163 (*his4, pep4, prbl*). Estas cepas tienen interrumpidos los genes que codifican para la proteasa A (PEP4) y/o proteasa B (PRB 1) y han sido bastante útiles en la producción de factor-I de crecimiento similar a insulina (Brierley y col., 1994) de anticoagulante antimetastásico de Ghilanten (Brankamp y col., 1995). Y de fragmento de unión a antígeno FAB (Rafael Trindade Burtet y col., 2007).

## **5. BIOPROCESOS CON *P. pastoris***

### **5.1. Estrategias de cultivo para la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris***

Las fermentaciones con cepas recombinantes *P. pastoris*, se llevan a cabo en dos etapas. En la primera, se busca el aumento de masa celular empleando un medio de cultivo mínimo, utilizando glicerol como fuente de carbono. En esta etapa se encuentra reprimida la producción de la proteína recombinante, debido a que el promotor del gen

*AOXI* que dirige su síntesis se encuentra inactivo. En la segunda etapa, este promotor se activa al agregar metanol al medio y convertirse en la única fuente de carbono disponible, siendo en esta etapa cuando se induce la expresión del gen heterólogo y se produce la proteína recombinante. Generalmente, para la producción a nivel fermentador se han empleado dos tipos de fermentaciones: de lote alimentado o *fed-batch* y de cultivo continuo.

Las estrategias de operación de cultivos de *P. pastoris* en fermentadores tienen que tener en cuenta los siguientes condicionantes:

- 1) Los cultivos se realizan a altas densidades celulares.
- 2) El efecto de la síntesis de la proteína heteróloga en la fisiología del microorganismo huésped (por ejemplo posibles efectos de toxicidad, los cuales pueden dar lugar a respuestas fisiológicas de estrés y a presiones selectivas para eliminar el gen foráneo).
- 3) El efecto de proteasas endógenas sobre la estabilidad del producto; existen diferentes estrategias para disminuir este problema: uso de cepas proteasa-defectivas, cultivo a pHs lejos del óptimo de actividad de las proteasas y adición de casaminoácidos en el medio de cultivo.
- 4) La producción eficiente de proteínas heterólogas, especialmente de aquellas que, por sus aplicaciones terapéuticas, tienen unos elevados requerimientos de calidad (actividad biológica, inmunogenicidad, grado de pureza).

Frecuentemente, las densidades celulares altas se consiguen utilizando concentraciones de substrato elevadas en el medio de entrada y/o caudales altos de alimentación. Es conocido que ambos parámetros tienen influencia en la fisiología de la levadura, pudiéndose producir etanol como un subproducto que puede acumularse en el medio de fermentación. La aparición de etanol tiene como consecuencia una

disminución en el rendimiento, ya que el etanol es un potente represor del promotor de la alcohol oxidasa. Además, la asimilación de metanol requiere de condiciones aeróbicas, por lo que el aporte de oxígeno al medio de cultivo es crítico, ya que puede producir problemas de formación de espumas y, en el peor de los casos, de insuficiente aporte de oxígeno. Cultivos de este tipo pueden llegar a requerir aireación con oxígeno puro. Por otra parte, pueden presentarse problemas de arrastre del substrato metanol (*stripping*), favorecido por los altos caudales de aireación necesarios, lo que se tiene que tener en cuenta, sobre todo si se quieren realizar cálculos de balances y rendimiento.

Una de las ventajas del sistema de expresión de *P. pastoris* es la relativa facilidad con la cual se puede escalar el cultivo de cepas recombinantes, de cultivos en matraz agitado a cultivos de alta densidad en fermentadores de gran volumen, sin perder productividad específica (Cregg y col., 1993). Se ha dedicado un esfuerzo considerable en la optimización de la producción de proteínas heterólogas en fermentadores, con lo cual se dispone de una variedad de esquemas de fermentación en *fed-batch*. En todos ellos se intenta sacar provecho de la ventaja que supone el poder separar el control del crecimiento celular de la producción de proteína en este sistema. El caso más extremo de dicha separación se conseguiría en un hospedero en el cual el gen *AOX1* o *AOX2* se han inactivado. No obstante, la decisión sobre que esquema de producción debe emplearse, así como los parámetros específicos de cada esquema, normalmente se determina de forma empírica (Cregg y col., 1993).

Todos los esquemas de fermentación se basan en el crecimiento de *P. pastoris* bajo condiciones represoras usando un exceso de glicerol y consiguiéndose la inducción de la expresión del gen heterólogo por la posterior adición de metanol. La estrategia de fermentación depende fuertemente de la constitución genética de la cepa, particularmente de su capacidad asimiladora de metanol (fenotipo Mut, Metanol

Utilization), pero se puede generalizar en las siguientes etapas:

1) Una fase de crecimiento discontinuo, donde se utiliza una fuente de carbono tipo glicerol, con el objetivo de conseguir una importante concentración de biomasa (a partir de 15-20 g L<sup>-1</sup> peso seco) en un periodo de tiempo mínimo. En esta fase en discontinuo no se tiene presencia de metanol, o bien éste está en concentraciones bajas y no se tiene producción de la proteína heteróloga.

2) Una fase de transición, en la que se utilizan diferentes estrategias para conseguir desrepresión de la ruta metabólica de asimilación del metanol.

3) Una fase final de producción de la proteína, que se realiza mediante cultivos *fed-batch*, adicionando metanol o bien una mezcla de metanol y otra fuente de carbono en condiciones limitantes.

## **5.2. Fermentación en lote alimentado o cultivos fed-batch**

La fermentación en lote alimentado se inicia con una fase de lote discontinuo o *batch*, en la que la fuente de carbono suele ser glicerol. La fermentación se lleva a cabo hasta el consumo de dicha fuente de carbono, lo que puede tomar de 18 a 24 h. Posteriormente se lleva a cabo una fase de lote alimentado o *fed-batch*, con un medio mineral que contiene glicerol y biotina (requerimiento nutricional fundamental que requiere *P. pastoris* para su crecimiento), durante 4 h aproximadamente. Durante esta fase la masa celular se duplica, alcanzando en este punto entre 80 y 400 g L<sup>-1</sup> de peso húmedo, dependiendo de la cepa. Esta fase puede ser manipulada variando la concentración de glicerol y/o la duración de la fermentación, para alcanzar la masa celular deseada antes de la inducción.

Posteriormente se lleva a cabo la fase de lote alimentado, pero ahora con metanol como única fuente de carbono. En esta fase es donde se inicia la producción de la proteína recombinante. Con clones Mut<sup>S</sup> los niveles de metanol se mantuvieron de

0.2 a 2% v/v mientras que para clones Mut<sup>+</sup> el nivel de metanol es cercano a cero, aunque el consumo de metanol es mayor. El tiempo de duración de esta fase puede ser de 48 a 200 h (Sreekrishna y Kropp, 1996; Higgins y Cregg, 1998), dependiendo de la proteína heteróloga.

### 5.3. Fermentación en cultivo continuo

El cultivo continuo se lleva a cabo como en un quimiostato, en condiciones estables, donde la velocidad de dilución es igual a la velocidad de crecimiento, manteniéndose de esta manera constante la masa celular y el volumen total. La etapa *fed-batch* se inicia con el empleo de glicerol o glucosa como fuente de carbono. La fermentación se conduce hasta que la fuente de carbono se consume completamente. La masa celular esperada con glicerol al 5% hasta este punto es de 80 a 100 g L<sup>-1</sup> de peso húmedo. Posteriormente, se establece la fase continua para la alimentación del medio con metanol, sales y biotina para clones Mut<sup>+</sup>. Para clones Mut<sup>S</sup> se emplean mezclas de metanol y glicerol como fuente de carbono para mantener el crecimiento celular (Sreekrishna y Kropp, 1996; Higgins y Cregg, 1998). En la búsqueda de fuentes de carbono que soporten el crecimiento pero que no repriman la inducción del promotor de *AOX1* por el metanol se ha encontrado que el sorbitol y la alanina son buenos substratos (Sreekrishna y col., 1997). Las fermentaciones en continuo, si bien son utilizadas para la producción de biomasa (Wegner, 1990), son muy aplicables para la producción de proteínas heterólogas, en especial en aquellos casos en que se usan cepas mutantes que poseen bajas velocidades de asimilación de metanol (cepas Mut<sup>S</sup>).

A continuación, se exponen algunas estrategias utilizadas para los diferentes tipos de cepas de *P. pastoris* según su capacidad asimiladora de metanol, resultado de las eliminaciones en uno o ambos genes *AOX*. En la bibliografía consultada hay muy



poca información sobre la optimización racional del proceso de fermentación, lo que parece indicar un vasto campo de mejora del mismo.

#### **5.4. Cepas Mut<sup>+</sup> (methanol utilization positive)**

Las cepas Mut<sup>+</sup> tienen ambos genes *AOX* funcionales y, por lo tanto, una capacidad de asimilar el metanol equivalente a la de las cepas silvestres. El principal problema para su cultivo en fermentadores, es que son extremadamente sensibles a la concentración de metanol residual. En presencia de exceso de oxígeno y metanol, los niveles de formaldehído, el primer producto de la asimilación del metanol alcanza niveles tóxicos para las células. Por ello, la fase de inducción en fermentaciones se realiza manteniendo niveles limitantes de metanol. Es más, cambios bruscos en los niveles de metanol en el medio tienen como resultado una pérdida de la actividad de la enzima AOX, pudiendo llegar a la muerte celular (Swartz y Cooney, 1981; Gleeson y Sudbery, 1988). Este problema fue parcialmente superado mediante una desrepresión graduada del gen *AOX*, utilizando como estrategia de fermentación la operación *fed-batch*, empleando glicerol como sustrato previamente a la fase de adición de metanol (Brierley y col., 1989). La máxima velocidad específica de crecimiento usando metanol como fuente de carbono es del orden de 0.14 h<sup>-1</sup>. No obstante, su alta sensibilidad a las concentraciones de metanol presentes en el medio hace difícil el control del mismo en cultivos de alta densidad celular y el cambio de escala a fermentadores industriales, por lo que se requiere equipos de seguimiento y control robustos. Además, la síntesis de AOX I (que puede llegar a suponer hasta el 30% de la proteína total en células crecidas en metanol) puede competir con la síntesis de la proteína heteróloga deseada.

Este tipo de cepas se ha utilizado, por ejemplo, para la producción de una glicoproteína humana (Katakura y col., 1998), lacasas fúngicas (Marcos López y col., 2009), y pleurocidina (Olive-Jean Burrotes y col., 2005) En este trabajo se planteó

como estrategia de suministro de sustrato en la etapa de transición una alimentación mixta decreciente en glicerol y constante en metanol, con el objetivo de acortar el tiempo de adaptación a la asimilación del metanol por parte del microorganismo, (es decir, a la síntesis *de novo* de toda la maquinaria enzimática necesaria y de los peroxisomas). En este estudio se realizó un análisis en línea de metanol mediante un sensor de gas semiconductor, que permitió comparar el efecto en la producción de la proteína recombinante al mantener diferentes concentraciones de metanol en el medio de cultivo.

### **5.5 Cepas Mut<sup>s</sup> (methanol utilization slow)**

Las cepas Mut<sup>s</sup> sólo tienen funcional el gen *AOX2* para la síntesis de alcohol oxidasa; por lo tanto, presentan como característica un nivel mucho menor de actividad de alcohol oxidasa, así como una menor velocidad específica de crecimiento del microorganismo en metanol (0.01-0.04 h<sup>-1</sup>) comparada con las cepas silvestres o Mut<sup>+</sup>.

La productividad específica de las cepas Mut<sup>+</sup> suele ser mayor en relación con las cepas Mut<sup>s</sup>, ya que se tiene la máxima capacidad de asimilación de metanol al estar disponible la expresión tanto de *AOX1* como *AOX2*, acortándose de manera importante el inicio del tiempo de producción. Sin embargo, las cepas Mut<sup>s</sup> no son tan sensibles a la concentración de metanol residual, lo que hace que el proceso sea más fácilmente controlable y escalable, consiguiendo altos niveles de expresión. Su productividad, sin embargo, suele ser relativamente baja, debido a que el tiempo de inducción es muy largo, incluso cuando los niveles de expresión de proteína heteróloga son altos. En este proceso se requiere de estrategias de adición continua de metanol durante largos periodos de tiempo, manteniendo siempre una concentración de metanol por debajo de un 0.5-0.8%. La fase de inducción se puede reducir mediante la alimentación mixta de sustratos no represores, tipo sorbitol y alanina.

Este sistema ha sido utilizado para la producción de dextranasa (Rodríguez-Jiménez y col., 1997), en la cual se emplean tres diferentes estrategias de adición de metanol en la fase de inducción. La primera es puramente empírica, ya que consiste en un incremento constante del caudal de adición de metanol en función del incremento de biomasa que se va produciendo. La segunda se basa en conocimientos previos del proceso, que permitió obtener una función matemática que relaciona la velocidad de adición de metanol con la biomasa presente en el medio. La tercera relaciona el incremento en la velocidad de adición de metanol con la consigna de mantener el porcentaje de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo en un valor superior al 20%. De esta manera, se relacionaría una subida del porcentaje del oxígeno disuelto con una capacidad mayor de degradación del metanol por parte del microorganismo. Todas estas estrategias son esencialmente empíricas, en particular las dos primeras, aunque son buenos ejemplos, que ponen de manifiesto las necesidades de monitoreo en línea de los parámetros principales de la fermentación (metanol y biomasa, principalmente) si se quiere realizar un control óptimo del proceso. Este trabajo presenta el inconveniente de que al no haberse realizado un seguimiento de la concentración de metanol, no se conoce la evolución del mismo a lo largo de la fermentación.

Por otra parte, (Chen y col., 1997) ponen de manifiesto un problema que será común a todos estos sistemas de producción con elevadas densidades celulares: el aporte del oxígeno necesario para conseguir mantener el sistema en condiciones aeróbicas, evitando la aparición de subproductos indeseables como el etanol y la formación de espumas, que puedan hacer la operación prácticamente imposible de controlar. Otro de los problemas que presentan ambos estudios, es el elevado periodo de tiempo entre el inicio de la fase de inducción (metanol) y la aparición de la proteína recombinante en el medio, unas 80 horas. La disminución de este tiempo de inducción

parece ser otro de los objetivos claros para mejorar el proceso de fermentación.

### **5.6. Cepas $Mut^-$ (methanol utilization negative)**

También se han construido cepas deficientes para ambos genes de la alcohol oxidasa. Estas cepas no pueden crecer en presencia exclusiva de metanol, si bien la inducción de la síntesis de la proteína heteróloga, la cual está bajo el control transcripcional del promotor de *AOX1*, es aún posible. Este tipo de cepas minimiza el uso de metanol y por lo tanto reduce los problemas de seguridad relacionados con el almacenamiento de grandes volúmenes de metanol (debido a su volatilidad e inflamabilidad, como ya se mencionó).

En el trabajo de Straton y col., (1998) se contemplaron diferentes estrategias en la fase de producción de una galactosidasa heteróloga: primero, la inducción en presencia de metanol como sustrato inductor no metabolizable; segundo, la alimentación (a distintas velocidades) de glicerol como fuente limitante de carbono y energía, simultánea a la adición de diferentes cantidades de metanol. Las velocidades excesivamente elevadas de adición de glicerol dieron lugar a una reducción en la actividad específica del producto y a masas celulares elevadas, debido a la represión parcial del promotor *AOX1* por glicerol y la formación de etanol como subproducto (Straton y col., 1998). En otros trabajos con este tipo de cepas se ha evaluado las posibles fuentes de carbono que no causan represión sobre el *AOX1*. (Mehmet Inan y Michael M. Meagher, 2001)

Como ya se ha comentado anteriormente, la mejor estrategia de fermentación y tipo de cepa vendrá muy influenciada por el tipo de proteína heteróloga que se vaya a producir. Independientemente del diseño global de crecimiento del microorganismo y de inducción de la proteína de interés, el punto clave de la fermentación es la etapa de inducción por metanol y el control del mismo para que se trabaje en las óptimas

condiciones de producción de la proteína. Por ello, el esquema y parámetros de la fermentación deben ser ajustados empíricamente para cada sistema y producto.

### **5.7. Medios de cultivo**

La selección y optimización del medio de fermentación es uno de los puntos centrales de cualquier crecimiento microbiano, y su realización apropiada permitirá alcanzar la máxima productividad del producto deseado. Se pueden emplear dos aproximaciones: la utilización de un medio complejo (extracto de levadura, peptona de origen animal y fuente de carbono y nitrógeno adicional) o la utilización de un medio sintético o definido. La ventaja del primero es que los nutrientes que necesita el microorganismo se encuentran prácticamente asegurados, pero no se conoce su composición exacta, pudiendo variar entre lotes, incluso del mismo proveedor. Además, la presencia, de proteínas en estos medios puede ocasionar un proceso más complejo de purificación del producto y por consiguiente más caro. A diferencia del medio complejo, la utilización de un medio sintético o definido hace que la reproducibilidad entre lotes sea mayor. Por otro lado, se evita la contaminación con otras posibles proteínas, o como mínimo del conocimiento de las presentes, que repercutirá en un proceso menos complejo de purificación del producto, y por consiguiente más económico. Los medios de cultivo comúnmente usados para *P. pastoris*, así como numerosos protocolos de inducción, se encuentran referenciados por la compañía Invitrogen Co. y son el producto de un proceso de optimización de trabajos previos (Cregg y col., 1993; Straton y col., 1998). Existen trabajos sobre la optimización del medio de cultivo para la generación de biomasa más recientes (A. Ghosalkar y col., 2008)

### **5.8. Suministro de oxígeno y agitación**

Este parámetro es de vital importancia operacional, ya que un control del

suministro de oxígeno y de la agitación en cultivos con elevadas densidades celulares puede ser causa de importantes problemas, como la formación no deseada de espumas debido a los elevados caudales de aire. Por consiguiente, el mantenimiento de un valor mínimo de oxígeno disuelto en el medio para optimizar el crecimiento y la producción que reduzca los problemas operacionales inherentes a estos sistemas, se presenta como uno de los puntos claves en el diseño de estrategias de control del proceso, sobre todo si se está pensando también en un posterior escalamiento. La transferencia de oxígeno viene determinada por el diseño del equipo de inyección de aire dentro del biorreactor. Cuando se está en una etapa avanzada del bioproceso, por encima de una concentración de  $60 \text{ g L}^{-1}$  de peso seco de biomasa, muchos equipos se encuentran al límite operacional en cuanto a agitación y al suministro de aire. Por tal razón, para conseguir una mejor transferencia de oxígeno se puede optar por trabajar con una corriente suplementaria de oxígeno puro en lugar de aire o con una sobrepresión en el fermentador.

### **5.9. Etapa de inducción o *fed-batch* con metanol**

La etapa de adición del metanol es la más importante en la selección de la estrategia de fermentación de *P. pastoris* para la producción de proteínas recombinantes, ya que de ella depende el éxito del proceso. En el metabolismo del metanol se generan subproductos tóxicos para la célula, como el formaldehído, el formiato y el peróxido de hidrógeno. Por tal motivo, es necesario determinar la velocidad de adición de metanol durante la etapa de *fed-batch* que sea lo menos perjudicial posible, en términos de viabilidad celular, y que asegure simultáneamente la óptima producción de la proteína recombinante de interés.

El principal factor que influye sobre la capacidad de asimilación del metanol por las células de *P. pastoris* es su fenotipo Mut, por lo que existen recomendaciones

generales según este fenotipo para la velocidad de adición del sustrato durante el principio de la etapa *fed-batch* con metanol. Las velocidades de adición se han de ajustar al desarrollo propio de cada proceso de cultivo en particular, con el propósito de que no se acumule metanol en el caldo de cultivo y se pudiera ver afectada la viabilidad celular (y, por lo tanto, la producción de la proteína recombinante de interés).

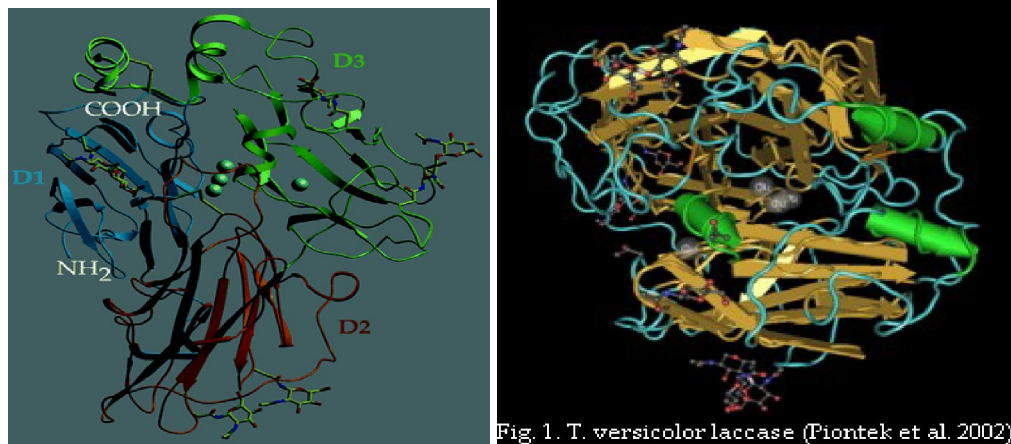
## **6. LACASAS: UN TIPO DE MULTICOBRE OXIDASAS**

Las lacasas (p-difenol: dioxígeno oxidoreductasa), junto con las ferroxidasas, ascorbato oxidasas, y otras enzimas, constituyen las proteínas multicobre oxidasas (MCOs). Las MCOs poseen secuencias y consecuentemente estructuras que intervienen en los sistemas redox relacionados con el ión cobre (Messerschmidt y Huber, 1997). También se denominan proteínas multicobre azules por el hecho de que el ión cobre de tipo I tiene un máximo de absorción a 610nm, dando el color azul a estas proteínas. Aunque estas proteínas son significativamente divergentes a nivel de secuencia, es evidente la similitud encontrada entre las estructuras terciarias de las mismas, así como en sus sitios redox (Solomon y col., 1996).

Las lacasas se han descrito en hongos (Hatakka, 1994), en plantas (Mayer, 1987; Mayer y Staples, 2002) y en bacterias (Diamantidis y col., 2000; Hullo y col., 2001; Sánchez-Amat y col., 2001). Las lacasas pueden ser moléculas monoméricas, diméricas o tetraméricas. En su forma activa son glicoproteínas. Usualmente portan cuatro átomos de cobre por monómero, unidos a tres sitios redox. Las lacasas fúngicas son secretadas en el micelio de hongos basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos (Gianfreda y col., 1999).

La lacasa fúngica mejor estudiada, que además se utilizó este trabajo, es la de *Trametes versicolor* (Bollag y Leonowicz, 1984) (Fig. 8) Es una p-difenol O<sub>2</sub> reductasa, que se diferencia de la mayoría de las fenoloxidasas en que produce agua en lugar de

peróxido en la reducción del oxígeno. Son glicoproteínas con cuatro átomos de cobre y de peso molecular variable. (D'Souza y col., 1996). Los átomos de cobre están clasificados en tres tipos (1,2 y 3) y tienen diferentes propiedades (Shin y col., 1996; Yaropolov y col., 1994).



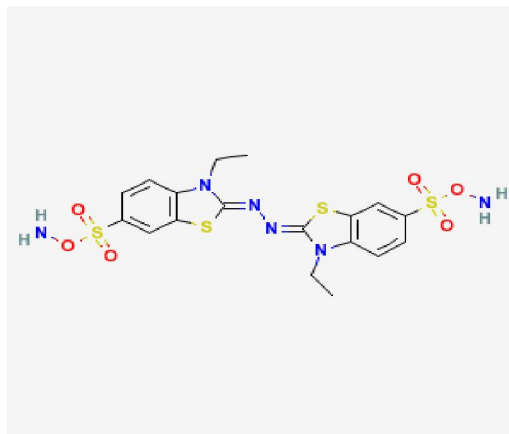
**Figura 8.** Ilustración que muestra la estructura terciaria de una lacasa típica de *Trametes versicolor*. En el interior de la estructura se pueden apreciar los 4 átomos de cobre

Las lacasas presentan un grado de inespecificidad de sustrato, puesto que catalizan la oxidación de orto y para difenoles, amino fenoles, dímeros de lignina fenólicos e incluso no fenólicos en presencia de algunos intermediarios (Kawai y col., 1988). La oxidación puede estar controlada por las diferencias en el potencial redox entre los sustratos reductores y el cobre tipo I de la lacasa (Thurston, 1994).

Mientras que las lacasas sólo pueden oxidar directamente subunidades fenólicas de la lignina, pueden a su vez reaccionar indirectamente con componentes no fenólicos de la lignina mediante la participación de mediadores redox (compuestos de bajo peso molecular, fácilmente oxidados por éstas), produciendo radicales muy inestables y muy reactivos, que pueden a su vez oxidar sustratos más complejos. Se han citado mediadores sintéticos como el 2,2' azinobis (3-etil-benzotiazonil-6-sulfonato (ABTS)



(Fig. 9) ó el 1-hidroxibenzotriazol (Bourbonnais y col., 1997; Pickard y col., 1999, Villaseñor y col., 2004) y naturales como el ácido 4-hidroxibenzoico, el 4-hidroxibenzol y 3-hidroxiantranilato (Bourbonnais y Paice, 1990, Eggert, 1996, 1997).



**Figura 9.** Representación esquemática de una molécula de ABTS. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Para la utilización de la lacasa con fines biotecnológicos y medioambientales, así como para el conocimiento de las propiedades de la enzima, se requieren grandes cantidades de la proteína, por lo que se han realizado multitud de estudios para la identificación de los mejores inductores, así como de los métodos de aislamiento y purificación.

Hasta el momento, varios genes de lacasas se han clonado, especialmente de hongos basidiomicetos, incluyendo *Phlebia radiata* (Saloheimo y Miao-Paavola, 1991) *Cryptococcus neoformans*, (Willianson, 1994), *Pleurotus ostreatus* (Giardina y col., 1995) *Trametes versicolor* (Jönsson y col., 1997), *Trametes villosa* (Yaver y col., 1996), *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert y col., 1998) *Coprinus cinereus* (Yaver y col., 1999). Algunos genes de lacasas se han clonado de hongos ascomicetos, incluyendo *Neurospora crassa* (Germann, y col., 1988) *Aspergillus nidulans* (Aramayo y Timberlake, 1990), *Podospora anserina* (Fernández-Larrea y Stahl, 1996) y *Miceliophthora termophila* (Berka y col., 1997). Las lacasas son comúnmente encontradas en hongos, sobre todo en hongos de pudrición blanca, y con actividad

ligninolítica, como *T. versicolor*. Recientemente también ha sido descubierta esta actividad en bacterias e insectos (Gianfreda, 1999; Martins. y col., 2002; y Claus, 2003).

### **6.1. Procesamiento y secreción de las lacasas**

Los genes de lacasas presentan secuencias en su extremo N-terminal que codifican para los llamados péptidos señal. Estos péptidos señal conducen a las lacasas hacia el espacio extracelular, siguiendo una ruta de secreción en la que se suceden diferentes eventos: un plegamiento cotraduccional en el retículo endoplasmático donde se generan los puentes disulfuro (Freeman, 1993), la incorporación de una secuencia precursora (Glucosa3-Manosa9-Glucosa-N-acetilglucosamina2) que se une a la mayoría de las secuencias NXT/S de la proteína (Gavel y Von Heijne, 1990), y la unión de iones calcio que estabilizan la estructura de la apolacasa resultante. Luego, en el aparato de Golgi tiene lugar la adición de los iones cobre (Taylor, 2005) y el procesamiento adicional de los carbohidratos, antes de ser secretadas. En este trabajo se utilizó el vector pPIC9 el cual incluye en su secuencia el péptido señal (factor  $\alpha$ ) de *S. cerevisiae*, puesto que el organismo donde se iba a clonar el gen de *T. versicolor*, era una levadura (*P. pastoris*).

### **6.2. Aspectos biotecnológicos**

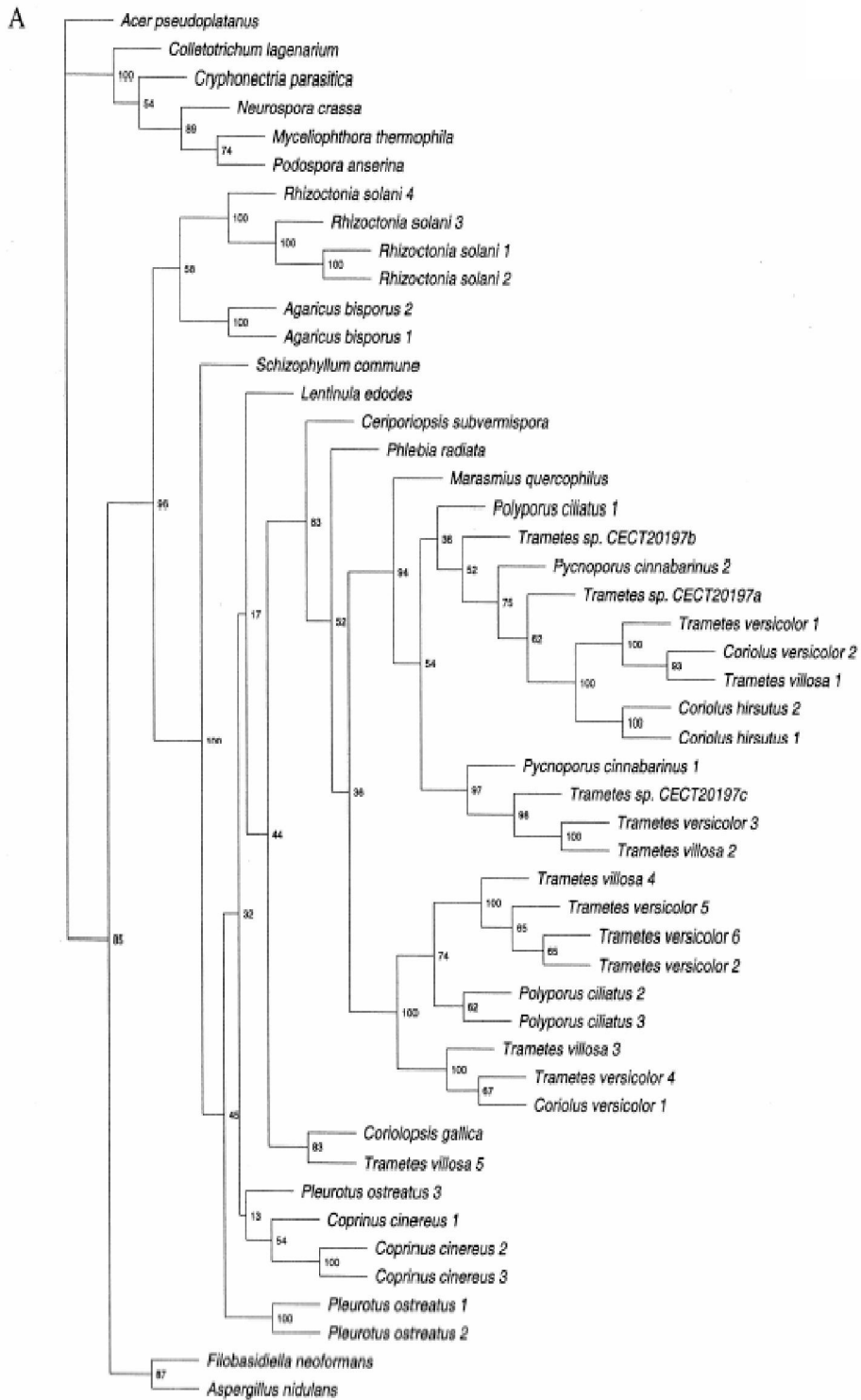
Los organismos productores de lacasas han evolucionado para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. En tales condiciones, cuando las lacasas son secretadas, funcionan de manera inusual. Esta habilidad adaptativa es importante en términos de aplicaciones industriales, como por ejemplo para el bioblanqueo en la industria textil (Novozymes A/S Dinamarca), y de pulpa de papel (Addelman y Archibald, 1993; Reid y Paice, 1994), en síntesis orgánica, y en biorremediación y para detergentes de lavado. También para desarrollar métodos con el fin de introducir características deseables a otras enzimas, como lo puede ser la estabilidad térmica a

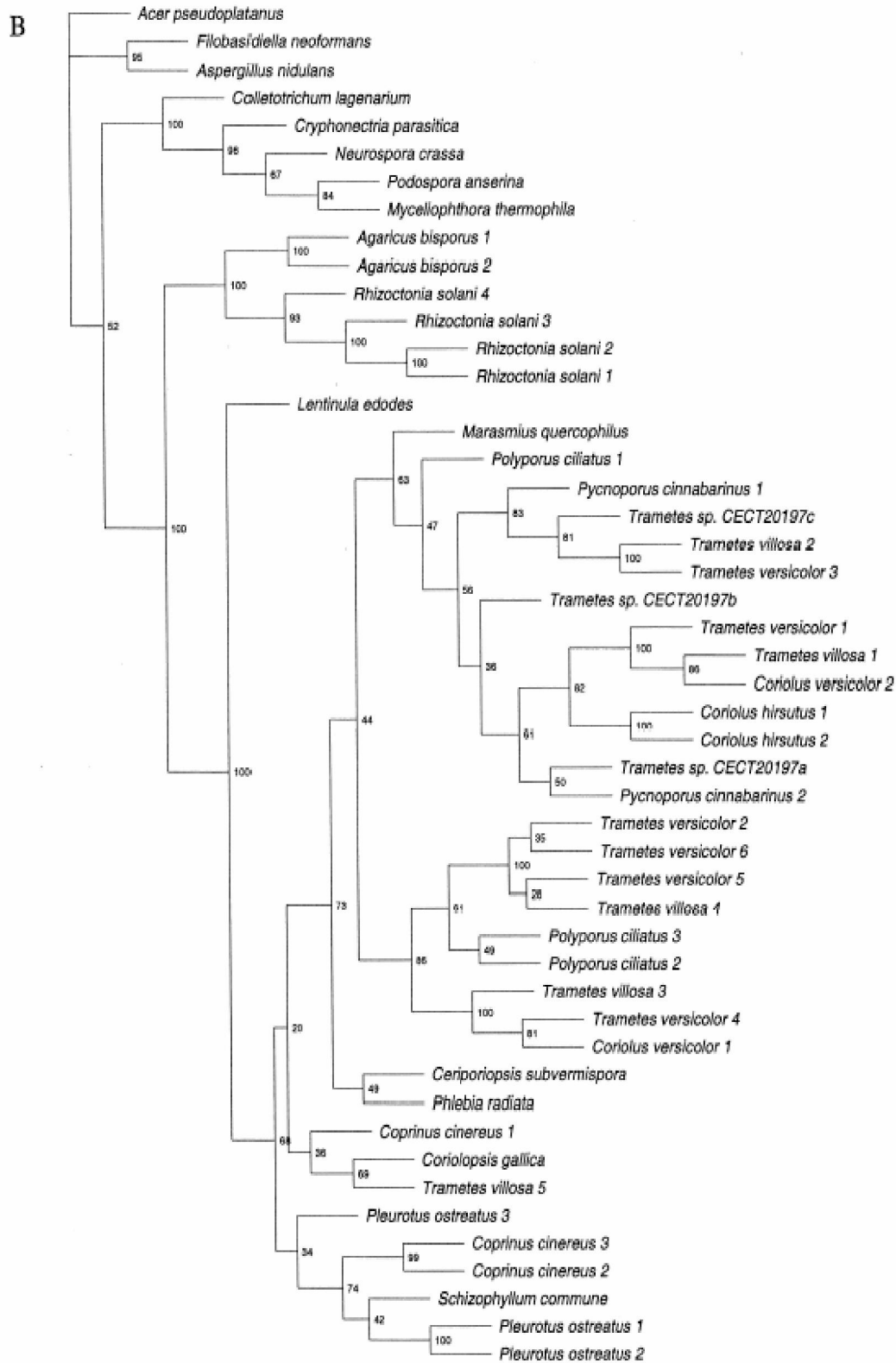
altas temperaturas (Suzuky y col., 2003) o en la estabilidad a condiciones extremas ácido/básicas (Xu y col., 1998; Shirai y col., 2001). Las principales aplicaciones de las lacasas se localizan en la industria del papel, concretamente en el blanqueo biológico, y en la destoxificación de efluentes industriales. Existen diferentes patentes a base de lacasas inmovilizadas, solas o con mediadores, como Pulp-Zyme, (Novo Nordisk, que utiliza lacasa-ABTS). Haciendo referencia a la destoxificación de efluentes, existen procesos que se basan en la decoloración y destoxificación en continuo del efluente con hongos inmovilizados, tal como el cultivo inmovilizado en alginato de *T. versicolor*. (Archibald y col., 1992). Otra aplicación de estas enzimas y de los hongos productores es la degradación de contaminantes. Los cultivos de *T. versicolor* inducidos para la producción de lacasa oxidan el antraceno y el benzo- $\alpha$ -pireno. Además la lacasa purificada oxida el benzo- $\alpha$ -pireno tras la adición de ABTS. (Collins y col., 1996; Loera Corral y col., 2006).

Las lacasas naturales no siempre se pueden adaptar a las diferentes aplicaciones industriales. Las principales limitantes son: (a) a la necesidad de usar un mediador redox para la oxidación indirecta de sustratos diferentes a fenoles y arilaminas, incluyendo la lignina. Los mediadores pueden actuar como agentes donadores de electrones debido a los radicales libres formados por la lacasa, expandiendo el rango de sustratos para la enzima, tales como compuestos no fenólicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos; (b) su actividad óptima es generalmente a pH ácido, lo que impide su uso en ambientes neutros.

Las técnicas de ingeniería genética permitirán obtener lacasas recombinantes modificadas con alto potencial de oxidación, amplio rango de sustratos, o activas a pH neutro. Ello implicaría realizar mutagénesis dirigida en las secuencias de lacasas cuyas estructuras cristalinas hayan sido determinadas. Aunque todas las lacasas fúngicas

poseen una estructura conservada en los sitios activos, exhiben un alto grado de diversidad en el resto de la estructura de la proteína (Fig. 10) y en su parte polisacáridica. Además muchos hongos producen isoformas (Mayer y Stapler 2002).





**Figura 10.** Dendrograma que muestra la diversidad genética de las lacasas de origen fúngico. Se introdujo el género *Acer* como grupo externo para la construcción del árbol. (Valderrama y col., 2003)

### **6.3. Regulación génica de las lacasas**

La expresión de las lacasas se ha descrito en sistemas constitutivos e inducibles. Varios componentes se han descrito como inductores de la expresión, así como optimizadores para la formación de las lacasas. Estos incluyen compuestos de naturaleza fenólica así como lignina y derivados de lignina (Gómez-Alarcon y col., 1989; Rogalski y col., 1991).

La actividad lacasa en los basidiomicetos en realidad, está codificada por varios genes (Saloheimo y Niku-Paavola, 1991; Jönson y col., 1997). Los estudios de secuenciación génica y de ADNc, han puesto de manifiesto que la mayoría de las lacasas muestran secuencias que suelen codificar para 520-550 aminoácidos (incluido el péptido señal) y que existen secuencias muy conservadas como las correspondientes a la unión del cobre (Thurston, 1994).

De forma general, está descrito que los genes de lacasa están regulados diferencialmente y los patrones de regulación son sustancialmente diferentes entre especies (Wahleithmer y col., 1995; Yaver y Golightly, 1996; Yaver y col., 1996; Smith, y col., 1998; Palmieri y col., 2000; Soden y Dobson, 2001). Los transcritos de lacasas de *P. radiata* son rápidamente detectados en condiciones limitantes de nitrógeno (Saloheimo y Niku-Paavola, 1991). En *T. villosa* el gen *lcc1* es fuertemente inducido en cultivos añadidos de 2.5-xylicidina, mientras los niveles de los transcritos de *lcc2* no cambian. Por el contrario, experimentos de Northern blot no detectaron transcritos *lcc3*, *lcc4* y *lcc5* en todas las condiciones (Yaver y Golightly, 1996; Yaver y col., 1996).

La profundización en el conocimiento de la regulación de la expresión génica en los sistemas naturales de producción, (hongos de podredumbre blanca), puede ayudar a diseñar los promotores mediante técnicas de ingeniería genética que permita optimizar

la expresión en sistemas de expresión heteróloga, o incluso incrementar la expresión de los sistemas naturales mediante la modificación de su sistema de regulación.

#### **6.4. Funciones biológicas de las lacasas**

Entre otras funciones, a las lacasas se las ha relacionado con procesos de deslignificación en hongos fitopatógenos de pudrición blanca (Leonowicz y col., 2001). Aunque otros estudios sobre funciones fisiológicas se encuentran aun bajo un intenso trabajo de investigación, se sabe que están implicadas en la síntesis y/o degradación de biopolímeros de lignina en respuesta a heridas y en mecanismos de morfogénesis de microorganismos. Entre las funciones biológicas de las lacasas también se incluyen la formación de pigmentos, (Salas y col., 1996) y patogenicidad, (Choi y col., 1992). En otros trabajos estas proteínas se las ha relacionado con destoxificación (Thurtson, 1994).

## **7. ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO**

### **7.1. Definición.**

Hesseltine (1972) empleó el término de fermentación en estado sólido a todas las fermentaciones donde el sustrato no es líquido. Posteriormente, Raimbault (1980) propuso un término más preciso: "Las fermentaciones en las cuales el sustrato no está ni disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua". No obstante, Moo-Young y col., (1983), propusieron un término a todos los procesos que utilizan materiales insolubles en agua para el crecimiento de microorganismos en ausencia de agua libre; autores como Mudgett (1986) y Durand. y col., (1988), han planteado una definición más general: "Es un método de cultivo de microorganismos sobre y/o dentro de partículas sólidas". El líquido ligado a las partículas sólidas debe estar en una cantidad que asegure la actividad del agua adecuada para el crecimiento y



el metabolismo de los microorganismos, pero sin exceder el máximo poder de retención de este líquido en la matriz sólida.

La definición más general y reciente fue formulada por Viniegra-González (1997), donde se plantea que "es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles". Esta definición abarca a procesos donde el soporte sólido es inerte y los sustratos que utiliza el microorganismo pueden ser sustancias solubles en agua, como el proceso de bioconversión de etanol y el crecimiento de *Candida utilis* sobre amberlita (Christen y col., 1993).

## **7.2. Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido comparada con el cultivo sumergido ó líquido.**

Doelle y col. (1992) consideran como ventajas los siguientes aspectos:

1) Los sustratos son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.

2) La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.

3) La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación. Tienen mayor productividad volumétrica.

4) La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.

5) Pueden emplearse, frecuentemente conidios como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y las manipulaciones en la preparación del inóculo.

6) Los conidios de los hongos que se producen son mucho más resistentes y tienen mejor adaptabilidad a las condiciones en las que se aplican como agente de biocontrol.

7) Estos procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

Entre las principales desventajas se encuentran:

1) La naturaleza sólida del sustrato trae consigo problemas al medir los parámetros de la fermentación tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos.

2) Muchos aspectos de ingeniería como el diseño de reactores y el escalado están menos caracterizados con respecto a fermentaciones en medio líquido.

3) El tiempo de fermentación generalmente es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento.

### **7.3. Influencia de factores ambientales en la fermentación en estado sólido.**

Las condiciones ambientales tales como la humedad, la actividad del agua, el pH, la temperatura, la concentración y disponibilidad del sustrato, la aireación, el tamaño de partículas y la forma de inoculación afectan significativamente tanto el crecimiento como la formación de productos. En el cultivo líquido agitado el control de las condiciones ambientales es relativamente simple, ya que estos sistemas son homogéneos desde el punto de vista de la concentración celular, nutrientes y productos. Sin embargo

se presentan serios problemas en los sistemas sólidos con el mezclado, la transferencia de oxígeno, el intercambio de calor y el control de la humedad y el pH, debido, principalmente, a la heterogeneidad y la consistencia del sistema (Doelle y col., 1992).

## JUSTIFICACIÓN

Las lacasas son de gran importancia en la actualidad, ya que tienen aplicación en varias ramas de la industria para la oxidación de diversos compuestos contaminantes encontrados, tanto en suelos como en efluentes producidos por las industrias (Suresh-Kumar y col., 2003). Las ventajas que ha presentado la fermentación en medio sólido con hongos filamentosos, en cuanto a fisiología del crecimiento y producción de enzimas recombinantes (Téllez-Jurado y col., 2006) llevó a pensar que este sistema podría ser aplicado en levaduras.

Teniendo en cuenta la importancia que está teniendo *P. pastoris* en la producción de enzimas recombinantes en gran cantidad de sectores industriales, (farmacéutico, el agropecuario y alimentario entre otras) junto con la ausencia de artículos que aborden este campo del conocimiento, condujo a diseñar un trabajo que permitiera desarrollar un análisis descriptivo del comportamiento de esta levadura cuando es cultivada sobre un soporte sólido como espuma de poliuretano y además produjera en este sistema de forma heteróloga una lacasa. Para ello se compararon estas dos variables sobre cultivo en medio sólido y en medio líquido.

## HIPÓTESIS

El cultivo en medio sólido tiene un efecto ventajoso en cuanto a la producción de biomasa sobre el medio líquido, debido a que la relación superficie/volumen es mucho mayor. Esto permite una mejor accesibilidad al oxígeno y un mejor aprovechamiento del sustrato cuando se incorpora al medio en altas concentraciones. La mayor accesibilidad al oxígeno permitirá obtener mejores rendimientos de biomasa por gramo de sustrato ( $Y_{x/s}$ ). La baja afinidad de la proteína AOX1 por el oxígeno condicionará los cultivos celulares con alta densidad y poca aireación, por ende, se esperaría obtener mayor cantidad de enzima recombinante en cultivos sólidos.

## OBJETIVOS



## **OBJETIVO**

Comparación de la fisiología de crecimiento y la expresión heteróloga de una lacasa en *P. pastoris* en cultivo sólido y cultivo líquido.

## **OTROS OBJETIVOS**

1). Estudio de la fisiología de *P. pastoris* en medio sólido utilizando espuma de poliuretano como soporte evaluando el posible comportamiento diferencial mediante el análisis de los parámetros fisiológicos ( $\mu$ ,  $X_{\max}$ ).

2). Evaluación de la capacidad de resistencia de los cultivos de *P. pastoris* sometidos a altas concentraciones de metanol, en soportes líquidos y sólidos.

3). Desarrollo de una técnica que permita aprovechar las ventajas de ambos sistemas de cultivo para aumentar tanto los rendimientos de biomasa del cultivo como los títulos de actividad enzimática de origen heterólogo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

## **1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS**

Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* JM109 y DH5 $\alpha$ . (Promega, Madison WI, USA). En la etapa de clonación de este trabajo se utilizaron las cepas *P. pastoris* KM71 (Mut<sup>s</sup>) y GS115 (Mut<sup>+</sup>).

### **1.1. Vectores de clonación utilizados**

Para la realización de las modificaciones e inserciones necesarias en el gen de lacasa, se utilizaron los vectores de clonación TOPO TA Cloning (Invitrogen), pGEM (Promega, Madison, WI, USA), y pPIC9. Este último se utilizó para transformar las cepas de *P. pastoris*. (Detallado en la fig 12, Apartado 8.1.1)

## **2. CONDICIONES DE CULTIVO**

### **2.1. Medios sólidos para bacterias**

Para el mantenimiento de los cultivos y la posterior toma de los inóculos, de las cepas bacterianas DH5 $\alpha$  y JM109 se utilizaron placas de Petri con medio LB (Luria-Bertani con agar). La siembra se realizó mediante estría, manteniéndose durante 16-20 horas el cultivo a 37°C.

### **2.2. Medios líquidos para bacterias**

En la propagación y mantenimiento de cepas bacterianas en soporte líquido se utilizó el medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose), cuyo contenido fue: 1% peso/volumen (p/v) extracto de levadura p/v, 2% p/v peptona, y 2% p/v dextrosa. El inóculo se mantuvo durante un intervalo de 14-16 horas a 37°C, con agitación constante de 150 rpm.

### **2.3. Conservación de cepas bacterianas**

Para conservar las cepas bacterianas, se cultivó durante un intervalo de 14-16 horas un volumen de 15 mL de medio LB con ampicilina. Se conservó a 4°C, para posteriormente utilizarse en un periodo no superior a 6 meses. La conservación a largo

plazo de estas cepas bacterianas se realizó iniciando el cultivo en las mismas condiciones e incorporando glicerol en una concentración entre 20 y 30% v/v. Posteriormente se conservó a -20 ó -80°C.

#### **2.4. Medios sólidos para levaduras**

Para la propagación de las cepas de levaduras, se utilizó el medio RDB (Regeneration Dextrose Base - agar). La siembra se realizó inoculando 100 µl de un medio de cultivo reactivado en una placa de Petri. El inóculo se extendió mediante asa de siembra, obteniéndose una gran cantidad de colonias. Una vez que las colonias alcanzaron un tamaño mediano, se asoció un número a cada una de ellas. Posteriormente, utilizando palillos estériles, se sembraron 24 colonias sobre una placa con lugares de siembra localizados y numerados en la superficie inferior de la placa, de manera que la colonia mantuvo su mismo número de identificación desde el primer crecimiento hasta las sucesivas réplicas. Para las réplicas se utilizó un replicador, que permitió hacer réplicas de 24 colonias al mismo tiempo. El número de identificación se mantuvo en la réplica que se hizo de las placas en nuevo medio RBD His<sup>r</sup>, de manera que se pudo tener un seguimiento del origen inicial de la colonia. Las colonias se mantuvieron durante 48 h a 30°C hasta alcanzar el tamaño idóneo, que permitió visualizar que la colonia había sido correctamente replicada.

#### **2.5. Medios líquidos para la conservación y propagación de levaduras**

La propagación de levaduras en medio sólido se llevó a cabo en medio YPD descrito en el apartado 2.2. manteniéndose a 30°C y 250 rpm durante un periodo de 16 – 20 horas. La propagación se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen ocupado de 20 mL. En los experimentos realizados para el análisis de la fisiología de las levaduras se utilizaron los medios BMG/BMM (buffered minimal glycerol o methanol medium).

### **2.5.1. Composición de los medios BMG/BMM**

Este medio está compuesto de los siguientes ingredientes comunes a ambos medios:

YNB (Yeast nitrogen base, Difco) 13.4%, buffer de fosfatos de pH 6 (constituido con  $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$ ), Biotina  $4 \times 10^{-5}$  % (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), adicionada a partir de una solución 500X. En ambos medios fue utilizada como fuente de N  $(NH_4)_2SO_4$  a una concentración de  $5 \text{ g L}^{-1}$ .

El medio BMG incorpora glicerol como fuente de carbono. La concentraciones utilizadas fueron 9.03, 32.64 y  $90.4 \text{ g L}^{-1}$ . Por su parte en el medio BMM la fuente de carbono es el metanol, y las concentraciones utilizadas en este trabajo fueron 0, 7.9 y  $31.6 \text{ g L}^{-1}$ .

En el caso del medio sólido se utilizó un soporte inerte constituido por espuma de poliuretano, que se confeccionó obteniendo cubos de 0.5 cm de lado, con la finalidad de incrementar la relación superficie/volumen. Posteriormente, se introdujeron 1g de este material en matraces Erlenmeyer de 250mL. Tanto para FML (Fermentación en medio líquido) como FMS (Fermentación en medio sólido), la temperatura fue de  $30^\circ\text{C}$ .

En cada uno de los medios destinados a la inducción de lacasa heteróloga se añadió  $CuSO_4$ , en una concentración  $200 \mu\text{m}$ . Puesto que es un compuesto necesario para completar la estructura de las lacasas producidas. (Marcos López y col., 2009)

## **3 PROTOCOLO DE CONSERVACIÓN DE CEPAS DE LEVADURAS**

### **3.1. Almacenamiento a medio plazo**

Un cultivo de *P. pastoris* se mantuvo a  $4^\circ\text{C}$  en medio líquido complejo (YPD) o en placas con agar YPD. Las células se cultivaron inicialmente en un medio definido (metanol mínimo selectivo, dextrosa o un medio con glicerol como MM, MD, o MGY para transformantes), y posteriormente se transfirieron a YPD. La mayoría de las cepas

usadas pueden ser almacenadas comúnmente en tales medios aproximadamente durante un año a 4°C. No obstante, las cepas deficientes en proteasas deben ser resembradas o recultivadas cada 2-4 semanas, debido a que no se conservan bien.

### **3.2. Almacenamiento a largo plazo**

Las células se resuspendieron a una  $DO_{600}$  de 50-100, (valores obtenidos por extrapolación a partir de muestras diluidas) en YPD con 15-50 % de glicerol. Las células se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , aunque preferiblemente deben ser mantenidas en congelación con nitrógeno líquido (conservadas a  $-196^{\circ}\text{C}$ ). Las células almacenadas de esta forma se mantienen viables durante varios años.

### **3.3. Protocolo de conservación**

La fuente de inóculo fueron cultivos originales de cepas recombinantes de *P. pastoris* de 48-72 h en medio YPD para su activación. Posteriormente, se inocularon 20 mL de YPD con 100-200  $\mu\text{L}$  de cada cultivo en condiciones de esterilidad. A continuación, se incubaron con agitación constante de 250 rpm a  $28-30^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 16-20 h, hasta que alcanzaron una  $DO_{600}$  de 16 ó 17. Seguidamente, se centrifugaron los 20 mL del cultivo anterior en un tubo Falcón estéril de 50 mL a 4000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Finalmente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 4 mL de medio YPD/glicerol al 15%, para tener una  $DO_{600}$  de 80. Posteriormente, se distribuyó esta suspensión celular en alícuotas de 500  $\mu\text{L}$ , para su conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **4. OBTENCIÓN DE BIOMASA PARA LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

El material de vidrio, plástico, y el agua destilada utilizados en este procedimiento se esterilizaron en autoclave. Se incubó el inóculo durante 18-20 horas

en las condiciones descritas en el apartado 3.3. hasta obtener el paquete celular. El sobrenadante se eliminó por decantación en condiciones de esterilidad.

#### 4.1. Soluciones utilizadas para la extracción de DNAg en levaduras

-Solución amortiguadora de TSNT: Tritón 100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100mM, y EDTA 1 mM pH 8.

-Solución fenol saturado: Con Tris HCl pH 8

-Solución Sevag: Cloroformo: Alcohol isoamílico en proporción 24:1

-Tampón TE (10:1): 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5

-Acetato sódico: 3 M pH 5

-Etanol al 96 y al 70% (v/v)

-Solución de RNAsa: se preparó una solución de 10 mg/mL de ribonucleasa pancreática (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en tampón 10 mM Tris-HCl y 15 mM NaCl pH 7,5. Se calentó a 100°C durante 15 minutos y se dispensó en alícuotas que fueron conservadas a -20°C.

#### 4.2. Protocolo de obtención de DNA genómico.

Se cultivó el inóculo a 28 – 30°C y 250 rpm durante 24 horas, recuperando la pastilla en un volumen aproximado de 3 mL, mediante dos centrifugaciones sucesivas a 13.000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se decantó el sobrenadante, agregando 200 µL de solución amortiguadora, agitando nuevamente por inversión. Posteriormente, se incorporaron en la mezcla 500 µL de la solución de fenol saturado, agitando nuevamente por inversión. Seguidamente, se adicionaron 100 µL de solución Sevag, mezclándose mediante vórtex durante 5 minutos. Consecutivamente, se agregaron 200 µL de solución TE 1X y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL. A continuación, el DNA se precipitó con una solución de etanol absoluto mezclando por inversión y manteniéndose a -20°C

durante 1 hora. El DNA se recuperó por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. Posteriormente el DNA se lavó con etanol al 70%, a fin de eliminar completamente las sales presentes, centrifugándose durante 5 minutos. Finalmente se secó a 37°C durante 15–30 minutos. Después se adicionaron 40 µL de agua-TE y 2 µL de RNAasa. Incubándose de nuevo a 37°C durante 1 hora.

#### **4.3. Soluciones utilizadas para la extracción de DNA plasmídico**

- Amortiguador de lisis: Glucosa 50mM, Tris HCl 25 mM pH 8 EDTA 10 mM
- Solución alcalina: NaOH 0.2 N, SDS 1%.
- Acetato de Amonio: 7.5 M pH 7.8
- Isopropanol absoluto
- Etanol: 70%
- Solución TE: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5
- Solución de RNAasa: se preparó una solución de 10 mg/mL de ribonucleasa pancreática (Sigma Aldrich St. Louis, MO) en tampón 10 mM Tris-HCl y 15 mM NaCl pH 7,5. Se calentó a 100°C durante 15 minutos y se dispensó en alícuotas que fueron conservadas a –20°C.

#### **4.4. Protocolo de extracción de DNA plasmídico**

A 4 mL de medio LB contenidos en tubos de ensayo, se les agregaron 16 µL de ampicilina 25 mg/mL para obtener una concentración de antibiótico de 100 µL/mL. Posteriormente se inocularon 10 µL del cultivo previo, y se incubaron toda la noche a 37°C. Seguidamente se recolectaron 4 mL de los cultivos de bacterias por medio de dos centrifugaciones sucesivas a baja velocidad (8.000 rpm) y se resuspendieron en 300 µL de amortiguador de lisis. Posteriormente se mantuvieron a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos, y se incorporaron 400 µL de solución alcalina recién preparada (a partir de NaOH 10 N y SDS 10%), mezclándose por inversión. A



continuación se colocó el tubo 5 minutos en hielo, y se agregaron 300  $\mu$ L de acetato de amonio, mezclando suavemente por inversión durante unos segundos. Consecutivamente, se mantuvo el tubo a 0°C durante 10 minutos para dejar que la mayoría de las proteínas, RNA de alto peso molecular y DNAg precipiten. A continuación se centrifugó durante 9 minutos a 14.000 rpm. Se transfirió a un tubo limpio el sobrenadante, y se incorporaron 650  $\mu$ L de isopropanol, manteniendo a temperatura ambiente durante 20 ó 30 minutos. Finalmente se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos, y se decantó el sobrenadante, lavando por inversión con 500  $\mu$ L de etanol al 70% (v/v) y centrifugando nuevamente durante 3 minutos a 14.000 rpm, para eliminar el etanol residual. (Mediante una micropipeta se eliminó completamente el sobrenadante, teniendo cuidado de no transportar nada de la pastilla). La pastilla se disolvió en agua o TE 1X con 2  $\mu$ L de solución de RNAsa (48  $\mu$ L), y se mantuvo a 37°C durante una hora.

## **5. OBTENCIÓN DE CÉLULAS CALCIO COMPETENTES**

### **5.1. Protocolo para la obtención de células calcio-competentes**

Se sembró mediante estría una alícuota de bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$  en una placa de Petri con medio LB y se incubaron durante 14 horas a 37°C, hasta obtener colonias. Posteriormente se levantó una colonia con un palillo estéril, llevando la colonia a un tubo de ensayo con 4 mL de medio líquido LB, y se incubó toda la noche a 37°C agitando vigorosamente. En un matraz de 500 mL se incorporaron 50 mL de medio líquido LB, y se añadió 0.5 mL del cultivo anterior asegurándonos de la frescura del cultivo. Posteriormente, se mantuvo en incubación a 37°C, monitoreando el crecimiento bacteriano por medio de la densidad óptica (DO) en el espectrofotómetro, hasta que alcanzó un valor de entre 0.3 y 0.4 con diluciones (1:10), esperando con ello situarnos al principio de la fase exponencial. A continuación, se colocó el matraz en hielo y se

mantuvo allí durante 10 minutos. En este punto se puede reservar una alícuota para su uso inmediato, conservándose a 4°C. El resto del cultivo se vació sobre un tubo Falcon de 50 mL frío y estéril. Se procedió a centrifugar a 5.000 xg durante 5 minutos, a 4°C, desechando el sobrenadante al final y trasladando siempre los tubos en hielo.

La pastilla de bacterias se resuspendió con la ayuda de un vórtex en 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío (-20°C), y se incubaron 20 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó nuevamente a 5.000 rpm a 4°C, durante 5 minutos, desechando el sobrenadante. Finalmente se resuspendió la pastilla de células en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Las células pueden conservarse a 4°C varios días. Para su mantenimiento a largo plazo, se procedió a congelar a -70°C. Para posteriores usos, se hicieron alícuotas de 40 µL en tubos Eppendorf, introduciéndose en hielo seco-metanol, o en nitrógeno líquido, a fin de que el congelamiento rápido evitara la formación de cristales de hielo y evitara la rotura de las membranas, al mismo tiempo que se mantienen los huecos realizados en la membrana por el CaCl<sub>2</sub> necesarios para las reacciones de transformación.

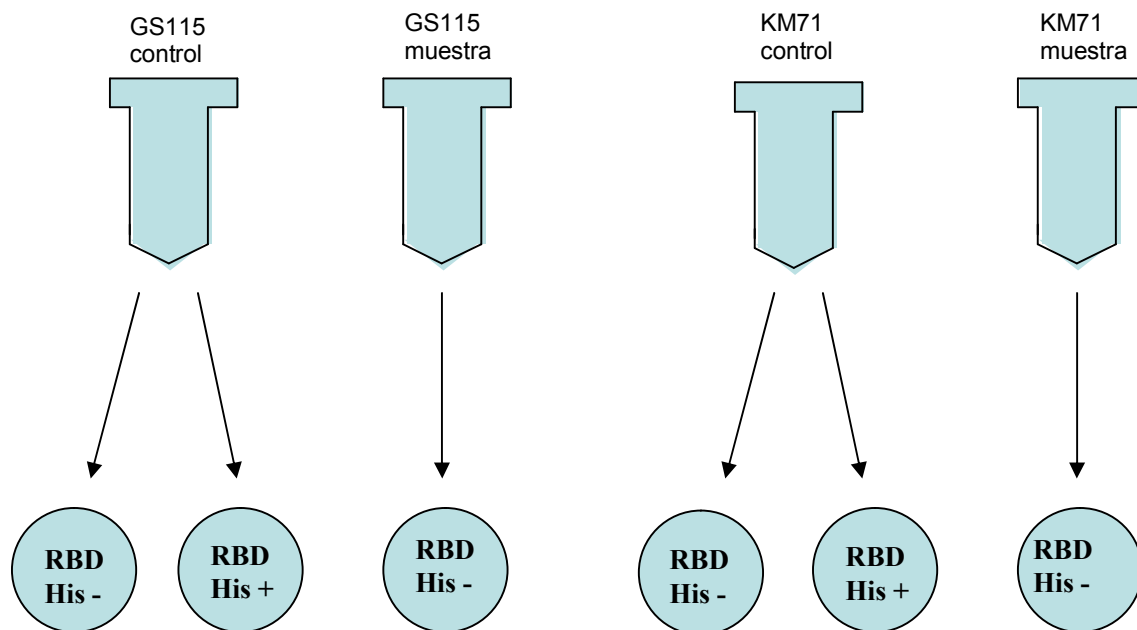
## **5.2. Soluciones utilizadas para la obtención de células Calcio-competentes**

Solución cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>): CaCl<sub>2</sub>.100 mM

## **6. OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRANSFORMANTES DE *P.pastoris***

Primeramente 10 µL del vector digerido pPIC9 (linearizado con una enzima de restricción que depende del mapa de restricción del plásmido con el que se desee transformar y de la secuencia del gen de interés que en el caso este trabajo fue *SacI*) se mezclaron con 100 µL de células calcio-competentes tanto de la cepa KM71 como de la GS115. A la mezcla resultante se le adicionó 1 mL de la Solución II del Kit Easy Competent (Invitrogen, San Diego, CA, USA) y se mezcló con vórtex. La mezcla se incubó 1 hora a 30°C en la estufa, y se le agitó con el vórtex cada 15 minutos. Posteriormente las células fueron sometidas a un choque térmico a 42°C durante 10

minutos, a fin de que el plásmido penetrase por los poros de las membranas celulares. Seguidamente las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 1 mL de la Solución III del mismo Kit. Las células se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se descartó el sobrenadante. Finalmente, las células se resuspendieron en 150 µL de solución III y se vertieron mediante asa de siembra sobre placa de Petri. (Fig 11)



**Figura 11.** Esquema que muestra la estrategia seguida tras la transformación con el plásmido pPIC9Lac. El plásmido porta el gen de la histidinol deshidrogenasa y las cepas comerciales carecen de este gen, por lo que la complementación por transformación con el vector permite el crecimiento en medios sin histidina. El medio utilizado es RBD sin aminoácidos, que permite discriminar entre medios con y sin histidina, proporcionando una presión de selección para los transformantes (tanto para cepas KM71 como GS115).

## 7. REACCIONES CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

### 7.1. Endonucleasas de restricción utilizadas

En este trabajo las reacciones de digestión se realizaron utilizando las enzimas *SacII*, *XhoI*, y *AvrII* (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.) y *NotI* y *HindIII* (Promega, Madison, WI, USA)

## **7.2. Protocolo para las reacciones de restricción**

En tubos para PCR de 50  $\mu$ L se mezclaron agua Mili Q estéril buffer de reacción hasta dejar la concentración 1X. Se añadió BSA (Seroalbúmina bovina) hasta ajustar la concentración en 100  $\mu$ g/mL a fin de optimizar la reacción. Las enzimas de restricción fueron adicionadas teniendo en cuenta el protocolo de New England Biolabs, donde por definición, 1 unidad de enzima de restricción puede digerir completamente 1  $\mu$ g de DNA sustrato. Teniendo esto en cuenta, se incorporó la cantidad de DNA diana correspondiente. Finalmente se obtuvo un volumen de 20  $\mu$ L. Esta mezcla fue incubada a 37°C durante un tiempo no inferior a 3 horas. Los resultados se visualización en geles de agarosa al 1%.

## **8. CLONACIÓN DEL GEN *LAC1* EN EL DNAg de *Pichia pastoris***

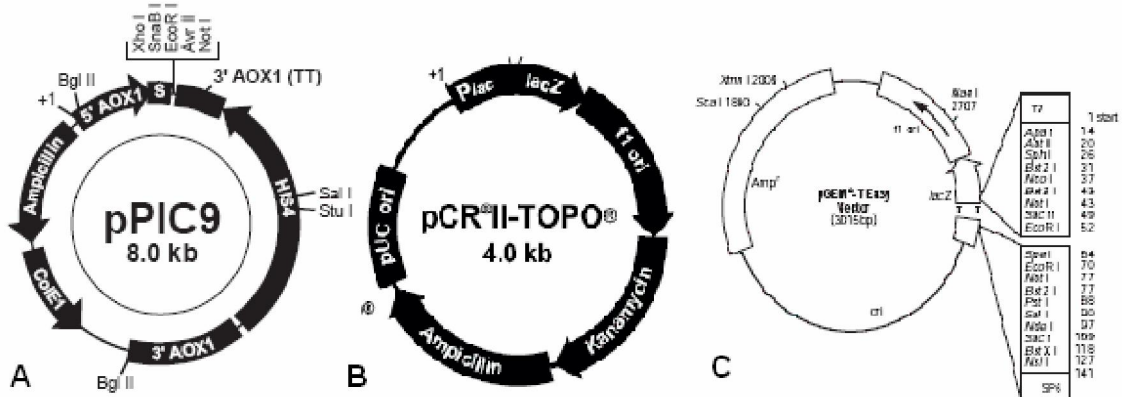
En este trabajo se diseñó una estrategia para manipular el cDNA del gen lacasa de *T. versicolor*. La estrategia se estructuró en sucesivos pasos con la finalidad de construir un nuevo vector de clonación dirigido a obtener levaduras que expresen lacasa de modo recombinante.

### **8.1. Construcción del vector de transformación de *P. pastoris* pPIC9Lac.**

#### **8.1.1. Vectores de clonación utilizados**

En este trabajo se utilizaron tres vectores de clonación (Fig 12). pGEM fue usado para introducir la ORF de 2500 pb extraída del plásmido pPFL26, la cual fue posteriormente secuenciada utilizando los oligonucleótidos universales SP6 y T7 (Apartado 8.1.3). Los vectores TOPO TA clonng y pPIC9 se utilizaron como herramientas intermedias en el proceso de construcción de un vector estructurado para

la transformación de cepas de *P. pastoris*, con el objetivo de construir cepas Mut<sup>+</sup> y Mut<sup>s</sup>.



**Figura 12.** Representación de los vectores utilizados. A) Vector pPIC9, B) vector pCRII-TOPO, C) vector pGEM Easy vector

### 8.1.2. Reacción de ligación con el vector TOPO TA cloning

La reacción de ligación incluyó 100 nanogramos de DNA procedente del producto de una PCR, que se adicionaron en un volumen de 5  $\mu$ L. Este DNA debió previamente haber sido tratado con *Taq* polimerasa (Promega Madison WI, USA) a una temperatura de 72°C durante 1 hora, con la finalidad de incorporar adeninas en los extremos, ya que este vector de clonación posee timinas en los extremos y la ligación necesita de complementariedad para llevarse a cabo. A este producto de amplificación se le añadió 1  $\mu$ L del vector de ligación TOPO. Posteriormente, la mezcla de reacción permaneció a 4°C durante toda la noche.

### 8.1.3. Secuenciación de ácidos nucleicos

Los productos de amplificación o de clonación, previamente purificados y cuantificados, se secuenciaron en un secuenciador automático Applied Biosystems por el servicio de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular (UNAM, México DF). La determinación de la secuencia, se realizó mediante el método de terminadores de cadenas marcados con fluorocromos (Sanger y col., 1997). La extensión de la secuencia

clonada en pGEM<sup>R</sup>-T, se realizó en ambos sentidos con los cebadores universales SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGGA-3') y T7(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').

#### 8.1.4. Identificación de secuencias en bases de datos.

Para búsqueda de secuencias homólogas a las de la lacasa de *T. versicolor*, depositadas en la base de datos Genbank, se usó el algoritmo de alineamientos BLAST, a través del servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para la identificación de la secuencia referente al péptido señal del gen de lacasa se utilizó el paquete informático Bioedit (Versión 5.0.6., North Carolina State University, Departament Microbiology). Este programa también fue utilizado para generar los mapas de restricción teóricos, y para confirmar las zonas de las secuencias homólogas a los oligonucleótidos diseñados para posteriores reacciones de amplificación.

#### 8.1.5. Reacción de ligación para fragmentos F1, F2 y vector pPIC9

Estas reacciones se realizaron siguiendo el protocolo de la Ligasa de T4 (Promega Madison WI, USA). Para ello se utilizó la relación matemática que ilustra la (Fig. 13).

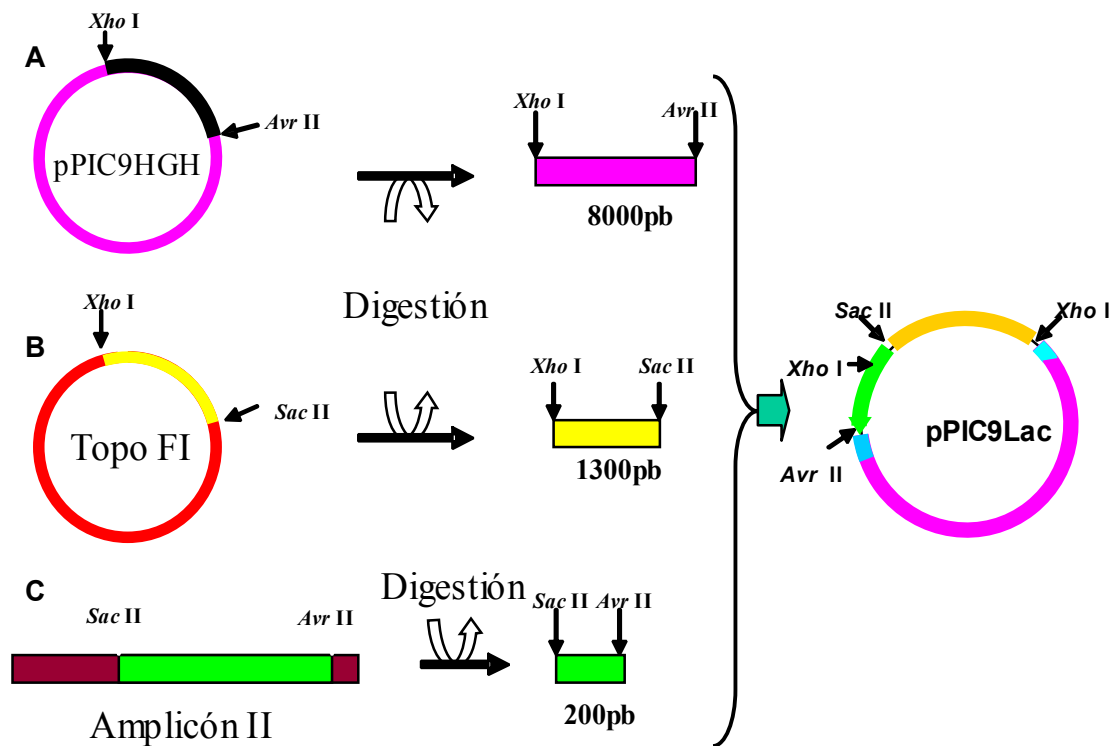
$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño (kb) de inserto}}{\text{Tamaño (kb) de vector}} \times \text{relación molar de} \frac{\text{Inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

**Figura 13.** Relación matemática que asigna las cantidades molares correspondientes a cada componente de la reacción de ligación para optimizar el proceso.

#### 8.1.6. Estrategia para la construcción del vector pPIC9Lac

La estrategia seguida en la construcción del vector pPIC9Lac incluyó tres fragmentos como se muestra en la Fig. 14. La reacción de ligación incluyó 1 µg de

DNA procedente del producto de una PCR amplificado a partir del vector TOPO F2, digerido con las enzimas *Sac*II-*Avr*II, 1  $\mu$ g del fragmento F1, procedente del vector TOPO F1 digerido con las enzimas *Xho*I-*Sac*II, y 2  $\mu$ g del vector pPIC9HGH, digerido con las enzimas *Xho*I-*Avr*II (donde previamente se eliminó la parte codificante del gen HGH), alcanzándose un volumen de 20  $\mu$ L. Para cada uno de los fragmentos de secuencias que intervinieron en la reacción de ligación, se realizó una purificación (ver apartado 11.1) a fin de eliminar los fragmentos que pudieran intervenir en la subsiguiente reacción de ligación triple. En esta ligación se realizó una variación del protocolo descrito en el apartado 8.1. prolongando el periodo de incubación a 4°C durante 72 h, con el objetivo de mejorar la eficiencia de la reacción.



**Figura 14.** Esquema que muestra la estrategia seguida en la construcción del vector pPIC9Lac. En la fila A se muestra el vector pPIC9 utilizado (pPIC9HGH) que incluía el gen de la hormona de crecimiento humana. Se utilizó únicamente la zona reguladora del vector, zona flanqueada por los sitios de restricción *Xho*I y *Avr*II. En la fila B se muestra el vector de clonación intermedio, Topo F1 que contenía el amplicón II utilizándose en este caso la zona flanqueada por los sitios de restricción *Xho*I y *Sac*II. En la fila C se muestra el amplicón II, que contenía un fragmento del gen 200 pb flanqueado por los

sitios *SacII* y *AvrII*. En la parte derecha de la figura se muestra el vector pPIC9Lac como debería estar estructurado teóricamente para ser introducido en el DNAG de *P. pastoris*.

### **8.1.7 Protocolo de transformación del vector TOPO TA cloning**

En primer lugar se centrifugaron brevemente los productos de ligación. Adicionándose 2  $\mu\text{L}$  de la reacción de ligación en tubos Eppendorf de 1.5 mL, y dejándolos sobre hielo. Alternativamente, se adicionaron plásmidos no cortados para determinar la eficiencia de la ligación. A continuación, se utilizaron los viales de células competentes conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Éstos se mantuvieron sobre hielo 5 minutos antes de ser utilizados. Se transfirieron 50  $\mu\text{L}$  de células competentes a cada tubo, se mezclaron cuidadosamente, manteniendo en hielo durante 20 minutos. Inmediatamente después se procedió a realizar un choque térmico durante 2 minutos a  $42^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se incubó en hielo durante un periodo de 2 minutos. Finalmente, las células se llevaron a tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían 950  $\mu\text{L}$  de medio LB a temperatura ambiente. Se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora, con agitación de 150 rpm. Un volumen de 150 a 250  $\mu\text{L}$  se extendió mediante asa de siembra sobre placas Petri con LB y ampicilina y finalmente se cultivó durante 16 – 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , esperando obtener unas 100 colonias por placa.

## **9. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA**

Se siguieron básicamente los métodos descritos por Maniatis y col., (1989); Sambrook y col., (2001). La separación de los fragmentos de DNA se efectuó por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1% de concentración y una corriente constante de 1 a 5 voltios  $\text{cm}^{-1}$ . El tampón utilizado fue TAE 1X y, con objeto de visualizar las bandas, se utilizó bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Manteniendo los geles en esta solución durante 15 minutos antes de ser iluminados con la luz ultravioleta. Se utilizó un tampón de carga 6X en la proporción 1:10 respecto a la mezcla de fragmentos



de DNA problema. Los geles se fotografiaron bajo luz UV en el equipo de documentación de electroforesis Gel Doc 2000 (Bio Rad). Los tamaños de los fragmentos de DNA se estimaron por comparación con muestras de los patrones de tamaños moleculares conocidos que se incluían en los geles, DNA  $\lambda$ /*EcoRI*+*HindIII* (Promega, Madison, EEUU) y  $\phi$ X174 DNA/*HaeIII* (Promega).

Las soluciones utilizadas en los geles fueron las siguientes:

TAE 50X: 40 mM Tris-Acetato, 2 mM EDTA

Tampón de carga 6X: Sacarosa 40%; azul de bromofenol, 0,25%; xilen-cianol, 0,25% (p/v).

### **9.1. Cuantificación del DNA genómico**

La cuantificación del DNA se efectuó mediante espectrofotometría a 260 nm. Se hicieron diluciones 1:100 de las muestras antes de medir la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Gene Quant (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia). La pureza del DNA se confirma con relaciones, entre ambas absorbancias superiores a 1,8. La cantidad de DNA se calculó considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50  $\mu$ g de dsDNA (Sambrook y col., 2001). De forma rutinaria, la cuantificación de DNA se realizó en geles de agarosa al 1% de concentración, comparando con concentraciones conocidas, según el protocolo recogido en el apartado 4.2.

## **10. AMPLIFICACIONES SOBRE DNA GENÓMICO**

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó mediante la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Saiki y col., 1985; Mullis y Faloona, 1987).

### **10.1. Amplificaciones de regiones adyacentes al gen que codifica el gen de *LacI* de *T. versicolor* dentro de pGEMLac**

Se utilizaron cebadores específicos para amplificar la secuencia del gen de lacasa incluida en el plásmido pPFL26, para posteriormente secuenciar y confirmar su número de referencia en las bases de datos BLAST.

## 10.2. Cebadores

Se utilizaron los siguientes cebadores en sentido 5' → 3'.

1: 5LX1: CGCTCTCGAGAAAAGAGCTATCGGGCCGGTGGCGAGC

2: 3LI: GCCATCGGGCCGGTGGCGAGC

3: LD5: GCCATCGGGCCGGTGGCGAGC

4: 3LA: CCTAGGTTACTGGTCGGCCTCGCT

### 10.2.1. Condiciones de amplificación

#### 10.2.1.1. Amplificación de la región LacI

La amplificación mediante PCR de las regiones adyacentes al gen que codifica para el gen LacI con los cebadores 5LX1, LI3, 3LA y LD5 se llevó a cabo en un termociclador PTC-100<sup>TM</sup> (MJ Research Inc., Watertown, EEUU), utilizando el kit de Biotools (Biotools B & M Labs, S.A., Madrid, España). Una primera amplificación sirvió para optimizar el proceso, definiendo las temperaturas a las cuales se iba a programar el termociclador. Para ello se empleó la expresión matemática:

$$T_m = \frac{\Delta H \frac{kca}{C \cdot Mol}}{\Delta S + R \ln([primer]/2)} - 273.15^\circ C$$

Donde R, es la constante universal de los gases (1.987Cal/°C\*Mol). ΔH, es la entalpía de la hélice de iniciación. ΔS es la entropía de la hélice de iniciación y la referente a la contribución de las sales. Se añadió 1 μg de DNA a una mezcla de reacción de PCR con una composición final de 1X de tampón del enzima, 0,2 μM de

cada uno de los oligonucleótidos iniciadores, 200  $\mu\text{M}$  de una mezcla de dNTPs, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 2,5 U de *Taq* polimerasa. La reacción se incubó en el termociclador durante 2 min a 94°C (desnaturalización inicial), posteriormente se programaron 30 ciclos, que comenzaron con la desnaturalización del DNA de doble cadena (1 min a 94°C), seguido de la hibridación de los dos oligonucleótidos iniciadores (1 min a 63°C) y la extensión del DNA en dirección 3' (1,5 min a 72°C). Después de los 30 ciclos, se realizó una extensión final durante 10 minutos a 72°C, para completar todas las hebras.

Los productos amplificados se detectaron en geles de agarosa al 1%, en los que se incluyó  $\phi\text{X 174 DNA}/Hae$  III como marcador molecular de tamaño del DNA.

#### 10.1.2.2. Concentración molar de los componentes en la mezcla de PCR

En la tabla 1 figura la relación de componentes en la mezcla de PCR, así como la concentración molar en un volumen final de 25 o 100  $\mu\text{L}$ .

| Reactivo        | Unid | Conc Stock ( $\mu\text{l}$ ) | Vol / Rx ( $\mu\text{L}$ ) | Vol mezcla<br>Rx/ $\mu\text{L}$ | Conc final Rx<br>( $\mu\text{l}$ ) |
|-----------------|------|------------------------------|----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Agua mili Q     |      | -                            | 13.3                       | 53.2                            | -                                  |
| Buffer 10 X     |      | 10                           | 2.5                        | 10                              | 1.00                               |
| dNTPs           |      | 10                           | 0.5                        | 2                               | 0.20                               |
| Primer 3'       |      | 5                            | 2.5                        | 10                              | 0.50                               |
| Primer 5'       |      | 5                            | 2.5                        | 10                              | 0.50                               |
| $\text{MgCl}_2$ |      | 2.5                          | 1.5                        | 6                               | 1.50                               |
| Taq Pol         |      | 5                            | 0.2                        | 0.8                             | 0.04                               |
| DNA molde       |      | -                            | 2                          | 8                               | -                                  |
| Vol final       |      | -                            | 25                         | 100                             | -                                  |

**Tabla. 1** Relación molar de los componentes de la mezcla de PCR

## 11. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Para la construcción del vector pPIC9Lac, el fragmento F1 procedente del vector intermedio TOPO F1, el fragmento F2 procedente del amplicón II, y la parte reguladora del plásmido pPIC9HGH se sometieron a una purificación después de las reacciones de restricción a los que fueron sometidos.

### **11.1 Protocolo para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa**

Para la purificación de fragmentos de DNA incluidos en geles agarosa se utilizó el protocolo de Gene-Clean de Roche.

Para aislar el DNA procedente de los geles de agarosa, en primer lugar se mezclaron 500 mL de NaI con el fragmento del gel de agarosa que portaba la banda con el DNA. Seguidamente el tubo se calentó a 50°C durante 10 minutos, mezclándose cuidadosamente durante el proceso. A continuación la solución fue transferida a una columna del Kit, la cual lleva una resina donde el material genético queda adherido. La siguiente fase consistió en aplicar un pulso de centrifuga a máxima velocidad, con la finalidad de hacer pasar la solución que contiene el DNA a través de la columna. Posteriormente se desechó el sobrenadante. Finalmente se adicionaron 20 µL de agua destilada al tubo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, de tal manera que el DNA quedó disuelto en el agua, desprendiéndose de la columna.

## **12. SOPORTE SÓLIDO PARA LAS FERMENTACIONES CON LEVADURAS**

El soporte sólido utilizado para los experimentos en sistemas FMS consistió en un soporte inerte de espuma de poliuretano (PUF). Este soporte fue reducido a cubos de aproximadamente 0.5 cm de lado, posteriormente se incluyó 1 g de este soporte en cada uno de los matraces. Las dimensiones deseadas para el soporte se consiguieron cortando la espuma con una tijera. Posteriormente, el PUF fue sometido a un doble lavado con agua a 100°C, y finalmente se lavó con agua destilada, con el objetivo de eliminar las

sales que pudieran haber quedado. El procesado del soporte finaliza manteniendo los cubos a 60°C durante un periodo de unas 14-16, horas eliminándose todo el agua que pudiera estar presente. La espuma se mantuvo en un desecador, para evitar la rehidratación de la misma, evitando con ello que pudiera ocasionar errores en el pesado del material que se incluye en cada matraz.

### **13. PROTOCOLO PARA EL MONITOREO DE LA BIOMASA EN LAS FERMENTACIONES**

La cantidad de biomasa en estas fermentaciones se reportó en gramos por peso seco. Se monitorearon una serie de puntos (por triplicado) que fueron variables en el tiempo, dependiendo de la duración de la fermentación. Estos puntos de monitoreo fueron más numerosos cuanto más larga fue ésta, obteniéndose 8 puntos de monitoreo para fermentaciones con 9.03 g L<sup>-1</sup> de glicerol, 10 puntos para fermentaciones con 32.64 g L<sup>-1</sup> y 11 puntos para fermentaciones con 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol.

#### **13.1. Medida de biomasa en sistema FML**

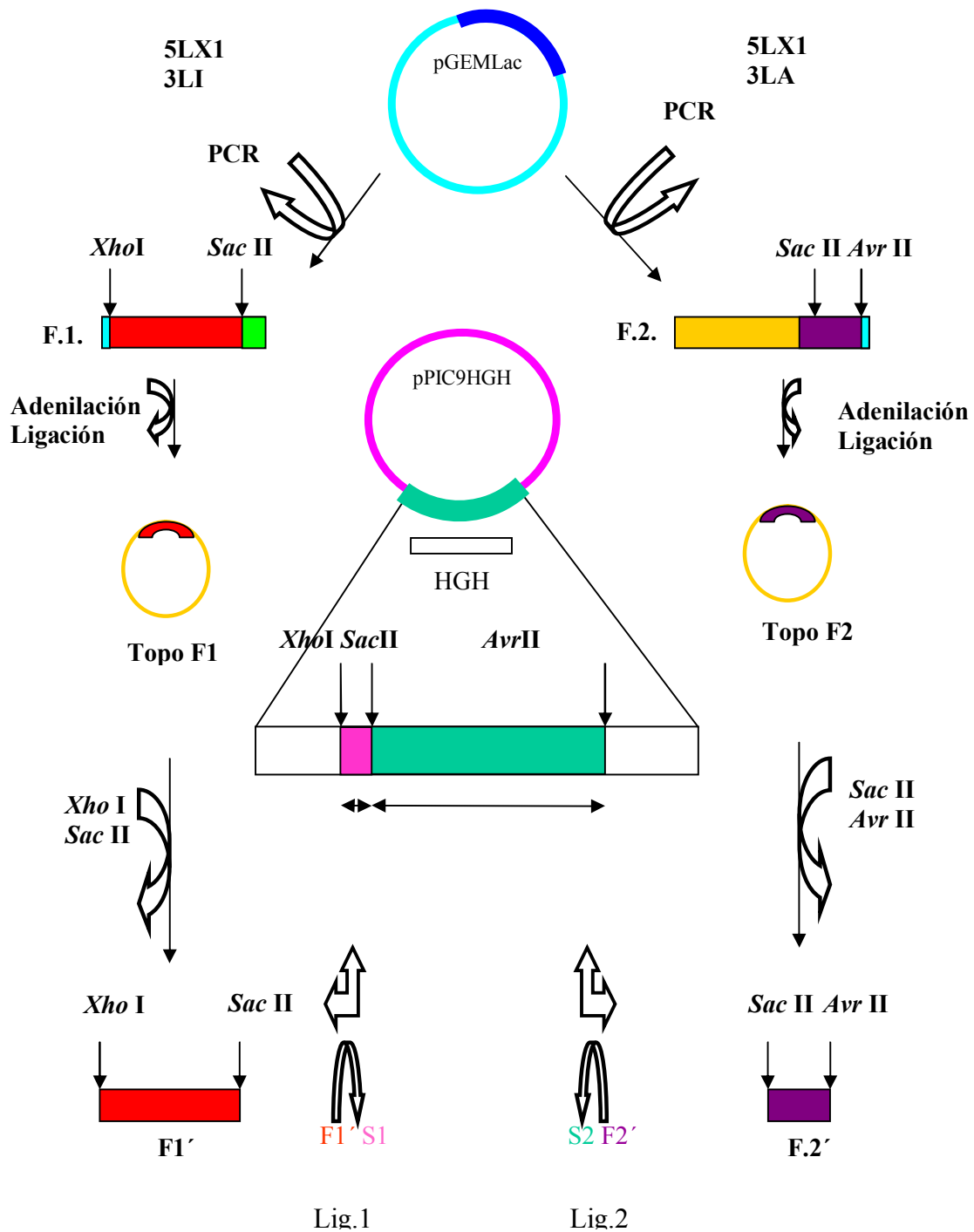
Para llevar a cabo esta medición se utilizaron membranas de nylon (Millipore Billerica, MA, USA) de 0.45 µm, que previamente fueron taradas utilizando una estufa de secado a 60°C, donde fueron incubadas durante un periodo de 12 a 16 horas (posteriormente se mantuvieron en un desecador hasta que alcanzaron temperatura ambiente y fueron pesadas en la balanza de precisión). A continuación, se vació el medio con las células en un tubo Falcon de 50 mL. A continuación y con la ayuda de una bomba de vacío se filtró el medio con las células a través de la membrana de nylon. Las células quedaron retenidas en el filtro y el medio fue recuperado en un matraz. A continuación, se midió el pH del medio y los filtros se incubaron a una temperatura de 60°C en una estufa durante 12 a 16 horas, siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito para las membranas libres de biomasa. Finalmente, se restaron los dos valores

(filtro sin biomasa tarado y el mismo filtro con biomasa, igualmente, tarado).  
Obteniéndose de esa manera el peso seco neto.

### **13.2. Medida de biomasa es sistemas FMS**

El protocolo seguido es exactamente igual que el descrito en apartado 13.1 pero con tres variaciones a considerar. A) Tanto las membranas de nylon, como la cantidad de espuma de poliuretano incluida en cada matraz son sometidas al mismo protocolo de desecado descrito en el apartado 13.1, con el fin de obtener el peso seco. B) El medio con células y el soporte sólido se depositaron en una jeringa de 50 mL exprimiéndose, y extrayéndose el medio. Este procedimiento se repitió tres veces añadiendo 30mL de agua destilada a fin de lavar todas las células y eliminar las posibles sales que pudieran quedar retenidas en el soporte. C) La espuma de poliuretano fue sometida a secado, después de la fermentación en la estufa para su posterior pesado en la balanza y sumar este dato al obtenido con las membranas de nylon.

## **14. ESTRATEGIA GENERAL PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS RECOMBINANTES DE *P. pastoris***



**Figura 15** Estrategia general para la construcción de las cepas recombinantes de *P. pastoris*

## 15. DETERMINACIÓN DEL GLICEROL Y TARTRATO DE AMONIO

El glicerol y el tartrato amónico presente en los medios fueron determinados en cada uno de los puntos de monitoreo mediante HPLC. El equipo HPLC estaba

constituido con una bomba binaria (Pump 250) y un detector LC-30 RI (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Todos los solventes utilizados fueron previamente filtrados utilizando un sistema Millipore (Millipore, Billerica, MA, USA), antes de ser utilizados. La fase móvil consistió en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM. La columna utilizada fue Animex HPX-87H 300 mm x 78 mm (Biorad, Hercules, CA, USA). Todo el proceso se llevó a cabo utilizando un flujo constante de 0.5 mL m<sup>-1</sup> y una presión de 760 psi, con una temperatura de 50°C. El volumen inyectado para cada una de las muestras fue 20 µL y el monitoreo se realizó a 230nm. Todos los solventes utilizados fueron de grado HPLC y el agua usada fue bidestilada.

## **16. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LACASA**

La determinación de actividad lacasa se realizó mediante la medición de la oxidación de ABTS (2,2' azinobis (3-etil-benzotiazonil-6-sulfonato)). La detección de actividad lacasa fue realizada utilizando un espectrofotómetro DV-640 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). El medio para la realización de esta reacción de oxidación estuvo constituido por 0.2 mM ABTS, disuelto en un buffer 50 mM de acetato, (pH 4.2), se agregó agua y 100 µL del sobrenadante recuperado de las fermentaciones, hasta alcanzar un volumen total en la cubeta del espectrofotómetro de 1 mL. Posteriormente se midieron cambios en la absorbancia a 420 nm, durante 5 minutos a 25°C de temperatura. La actividad lacasa fue expresada en unidades por litro (U L<sup>-1</sup>), donde una unidad se define como la cantidad de enzima que produce 1 micromol de ABTS oxidado por minuto bajo las condiciones de ensayo. Para calcular la actividad enzimática a partir de las lecturas del espectrofotómetro se utilizó la ley del Lambert - Beer y el coeficiente de extinción molar del ABTS (36.000)

## **17. TOMA DE MICROGRAFÍAS**



Las micrografías tomadas sobre el cultivo se hicieron a varios tiempos a lo largo de las cinéticas (24, 48 y 96 h). Las muestras de levaduras recombinantes se cultivaron durante 96 h utilizando medio BMG suplementado con 9.04, 32.64 y 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol. A lo largo de la cinética, los cultivos fueron fotografiados a 10X, 40X y 100X en el analizador de imágenes BOECO BM-180 (Boeckel & Co., Hamburg, Germany), equipado con una cámara digital y el programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA)

## **18 METODOLOGÍA PARA LA INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA SOBRE LOS CULTIVOS**

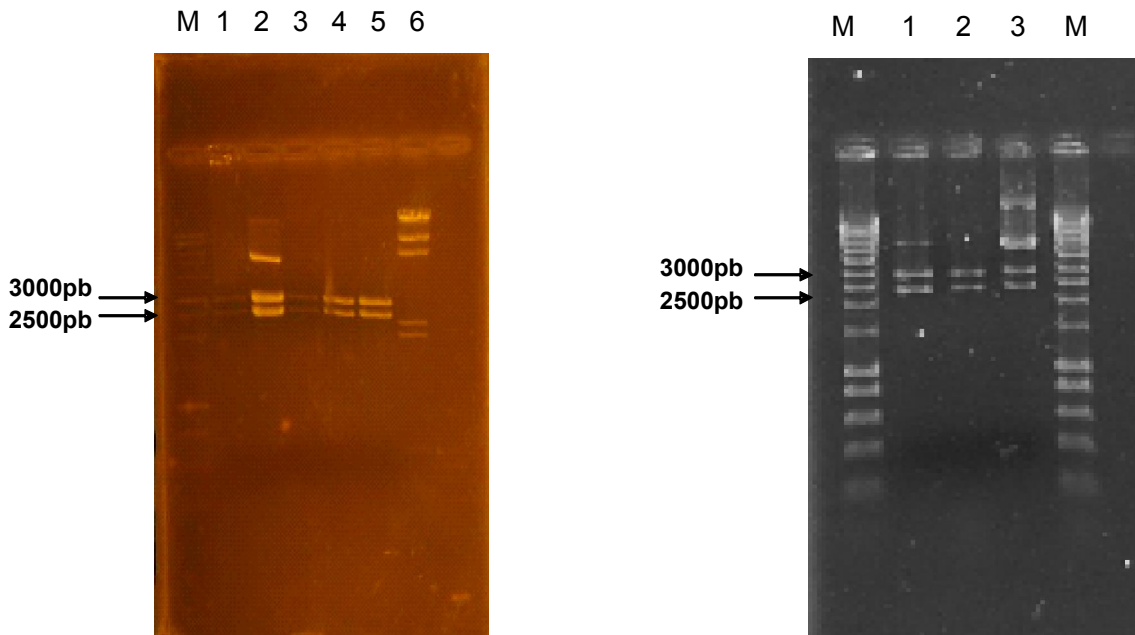
La metodología seguida para inducir la expresión heteróloga de lacasa sobre los cultivos se estructuró de la siguiente manera:

Para los cultivos en medio líquido, la incorporación del metanol en los medios con células se realizó mediante micropipeta, homogeneizando el metanol mediante agitación del medio. Sin embargo, para los cultivos en medio sólido la incorporación del metanol se realizó en dos modalidades dependiendo de la situación experimental. En algunos experimentos las células producidas en cultivos sólidos fueron extraídas y posteriormente fueron inducidas en un matraz con medio líquido donde se homogeneizó el metanol. Y posteriormente fueron repartidas sobre nuevo soporte sólido estéril. O bien, las células permanecieron creciendo en medio BMG embebidas en la espuma de poliuretano y posteriormente, el metanol fue incorporado mediante un atomizador sobre los cubos de espuma de poliuretano, de manera que el inductor se repartió de la manera más homogénea posible con el consiguiente mantenimiento de la estructura de los agregados celulares.

## RESULTADOS

## 1. IDENTIFICACIÓN DE LA ORF DE LA LACASA DE *Trametes Versicolor*

Para proceder a la identificación de la secuencia, preliminarmente se realizó una doble restricción sobre el vector pPFL26, utilizando las enzimas *NotI* y *HindIII*, liberándose una banda de 2500 pb que se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. (Fig 16 y 17).



**Figura 16. (izquierda).** Fragmentos liberados del vector pPFL26 mediante la reacción de restricción *NotI* y *HindIII*. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1%. Los marcadores utilizados fueron el  $\lambda$  *HindIII/EcoRI*. **Figura 17. (derecha).** Fragmentos liberados del vector pGEMlac mediante la reacción de restricción *EcoRI*. El gel de electroforesis se hizo a una concentración del 0.9%.

El fragmento liberado, se introdujo en un vector de clonación intermedio (pGEM Easy vector) tras una poliadenilación previa incubando a 72°C el fragmento durante 1 h. Este vector fue utilizado para llevar a cabo la secuenciación. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos universales SP6 y T7 mencionados en la sección 8.1.3. de materiales y métodos. Esta secuencia de DNA contenía la parte correspondiente al promotor, al péptido señal, la zona codificante (ORF) así como la parte correspondiente al terminador. La secuencia se identificó en Gen-Bank con el número de referencia AY049725, publicada por Dobson en 2002.

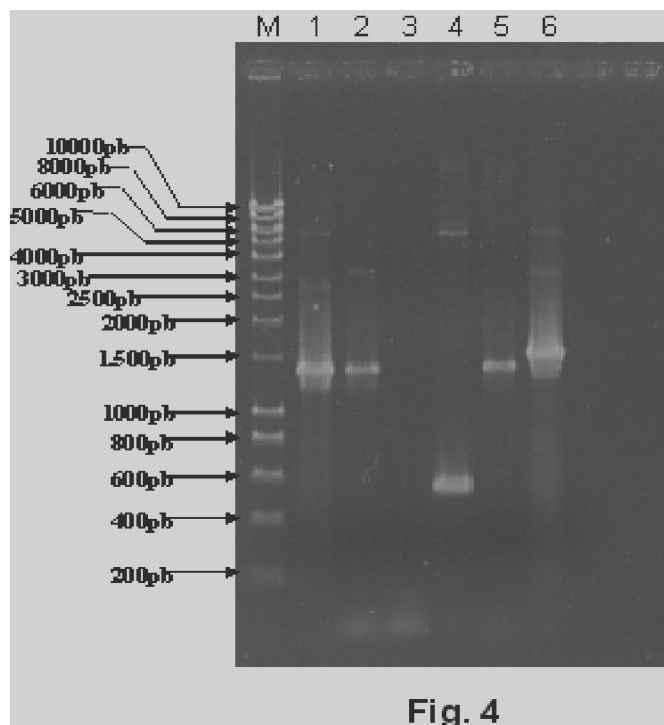
La secuencia identificada en la base de datos fue la siguiente:

```
1 GGCATACTCTCCGCTCTCGTTGGCTGCGTGCAGTACCTTGTACACCCAAGATAGCGCGT
61 TTCTGCCCAAATAGCGGTTCGAAATGCCCCCGCATCCTCTCCCGAGTACTAGCATCCCA
121 ACCGATCCGACCCGCTCGAACAGCTCATGAATTACCGAATCCATGGACCCGCCCATCGGC
181 GTAGTCAGTTACGATCAAGCAGACCTGAAGGGTCTTCCAGTGCACCTGGGCTACCCGCGCA
241 TCCGGCGCTGCATCTACGCGCCTTCCCGGCGCATTATAGACGCATGTTGGCCACCACAGC
301 CCTCCTGGCTCTCTTCCGCCACCAGCGCGGCGCACAACCGTGGGACCCAGCACACTCCC
361 GCCCACTCTCACACTGGCCAAATTCGCGCAACCGCCGCTTTTTCAGGCCCAAATAAATCGG
421 GCAGGTTTCAATGGCGCACGCCGTCGTGCCGTGCCGGATTCAATTGTGGGCCATTCCGGCA
481 TCCGGATGCCCTTACCACCGCGGTTGACTGGAAAAAACACCGAGGTCATGCATTTCTGGC
541 CAATTGCGGCCAAAGGACCGCCGCTGGTGCAGGTTACTTAAAGGGCGGCCCGGGGAGGC
601 CTGTCAACCAAGCTCAAGCTCGCCTTGGGTTCCAGTCTCCGCCATCCTCCTCCTCCCC
661 ACACACTCGTTCATATCAGCTCGGCGCCATGGGTCTGCAGCGGTTTCCAGTCTTCTCGTCA
721 CCCTCGCGCTCGTTCGCTCGTCTTTCGAGCCATCGGGCCGGTGGCGAGCTTTCGTCGTCG
781 CGAACGCCCCGCTCTCGCCGACGGCTTCCCTCGAGATGCCATCGTGGTCAACGGCGTGG
841 TCCCTTCCCCGCTCATCAGGGCCAAGAAGGGAGACCGCTTCCAGCTCAACGTCGTCGACA
901 CCTTAACCAACCACTCCATGCTCAAGTCCACTAGTATCCACTGGCAGGGCTTCTTCCAGG
961 CAGGCACCAACTGGGCAGACGGACCCGCGTTCGTCAACCAGTGGCCTATTGCTTCCGGGC
1021 ATTCATTCCTGTACGACTTCCATGTGCCGACACAGGCAGGGACGTTCTGGTACCACAGTC
1081 ATCTGTCTACGCAATACTGTGACGGGCTGCGAGGACCGTTCGTTCGTGTACGACCCCAAG
1141 ATCCGCACGCCAGCCGCTACGATGTTGACAACGAGAGCACGGTCATCACGTTGACCGACT
1201 GGTACCACACCGCTGCCCGGCTCGGCTCCAGGTTCCACTCGGCGGGACGCCAACGGTCA
1261 TCAATGGTCTTGGGCGGTTCGGCTCCACTCCACCGCCGCGCTTGCCTGTGATCAACGTC
1321 AGCACGAAAAGCGCTACCGCTTCCGTCTCGTTTCGATCTCGTGCAGCCGAACCTACACGT
1381 TCAGCATCGACGGGCACAATCTGACCGTTCATCGAGGTCGACGGTATCAACAGCCAGCCTC
1441 TCCTTGTGCGACTCTATCCAGATCTTCGCCGCGCAGCGCTACTCCTTTGTGTTGAATGCGA
1501 ACCAAAACGGTTCGGCAACTACTGGGTCGGTGCGAACCCGAACCTTCGGAACGGTTGGGTTTCG
1561 CCGGGGGGATCAACTCCGCCATCCTGCGCTACCAAGGCGCACCGGTCGCCGAGCCTACTA
1621 CGACCCAGACGCCGTCGGTGCATCCCGCTCATTTGAGACGAACCTTGCACCCCTCGTTCGCA
1681 TGCTGTGCTTGGCACCAGGACCGCCGAGGTTGTTGACAAGGCACTGAAGCTGGCCTTCA
1741 ACTTCAACGGCACCAACTTCTTTATCAACAACGCGTCTTTCACACCACCGACAGTCCCCG
1801 TGCTCCTCCAGATCCTGAGCGGTGCGCAGACCGCACAGGAACCTCCTCCCTGCAGGCTCCG
1861 TGTACCCGCTCCCGGCCACTCCACCATCGAGATCACGCTGCCCGGACCGCAGTACGCC
1921 CAGGCGCGCCGACCCCTTCCACCTGCACGGTTCACGCGTTCGCGGTTCGTCGCCGAGCGAG
1981 GCAGCACTACGTATAACTACAACGACCCGATCTTCCGCGACGTCGTGAGCACCGGCACGC
2041 CCGCCGCGGGCGACAACGTCACGATCCGCTTCCAGACGGACAACCTCGGGCCGTTGGTTCC
2101 TCCACTGCCACATCGACTTCCACCTCGAGGCGGGCTTCGCGATCGTGTTCGCGGAGGACG
2161 TTGCGGATGTGAAGGCGGCGAACCAGGTCGCCAAAGGCGTGGTTCGGACCTGTGCCCGATCT
2221 ACGACGGGCTGAGCGAGGCCGACAGTGAGCGGAGGTTGGTGTGAGCGTGAAGCTCGAGC
2281 GTCGACCTTGGGGGATTTGGCAAGGTTTCTCATTGAACCTAGTCTTTGGGTTTATTTGTT
2341 GTTATTCTAACTCGCTTCTCTACGGAATGACTGAGAGTTGTATAGGATGAAGTAACTTTC
2401 TTAATGTA
```

## 2. AMPLIFICACIONES SOBRE VECTOR pGEMLac

Para realizar las amplificaciones sobre este plásmido, se utilizaron los oligonucleótidos 5LX1, 3LI, 3LA, y LD5 diseñados en este trabajo y mencionados en materiales y métodos (10.2). En la figura 18 se muestra una serie de reacciones de amplificación realizadas sobre este vector, para caracterizar la estructura del plásmido y confirmar la presencia y la orientación de la secuencia del gen de lacasa. Cuando se utilizaron los oligonucleótidos 5LX1 y 3LI se generó una banda de 1365 pb

correspondiente a la ORF del gen de lacasa que se denominó fragmento *FI*. En otra reacción de amplificación análoga se utilizaron los oligonucleótidos 3LA y LD5, obteniéndose un fragmento de 560 pb que se denominó fragmento *FII*. Esta terminología se utilizó para generar la nomenclatura de los componentes en la etapa de clonación. En etapas posteriores del procedimiento de clonación se utilizaron los fragmentos *FI* y *FII* para construir los vectores TOPOFI y TOPOFII.

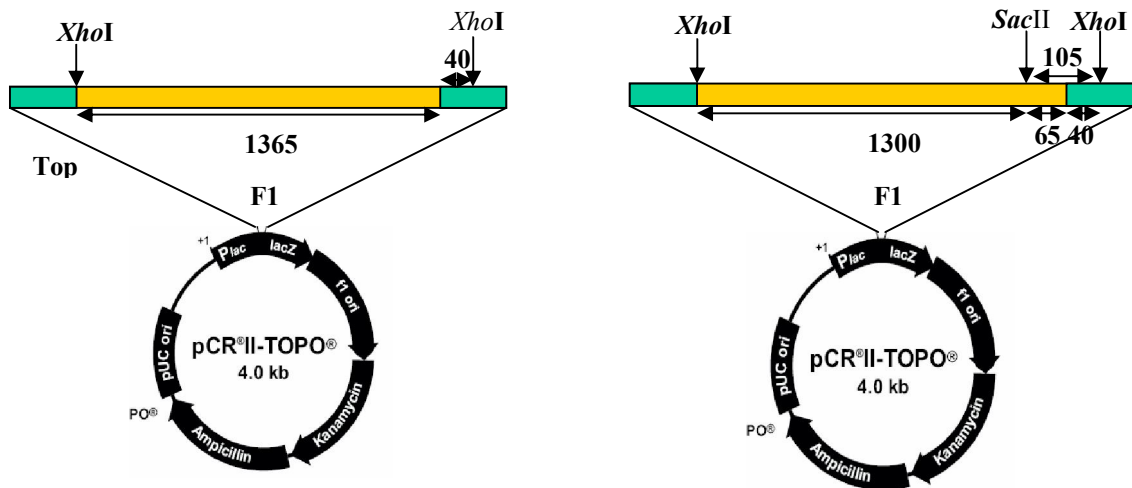


**Figura 18.** Fragmentos amplificados utilizando: En el carril 1 los cebadores 5LX1-LI3. En el carril 2 los cebadores 5LX1-LI3. En el carril 3 el control negativo. En el carril 4 los cebadores 3LA-LD5. En el 5 los cebadores 5LX1-LI3. Y en el carril 6 los cebadores 5LX1-3LA. Las bandas se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 0.9% y tinción con bromuro de etidio. El marcador utilizado fue el Hyperlader 1. (Promega, Madison, WI USA)

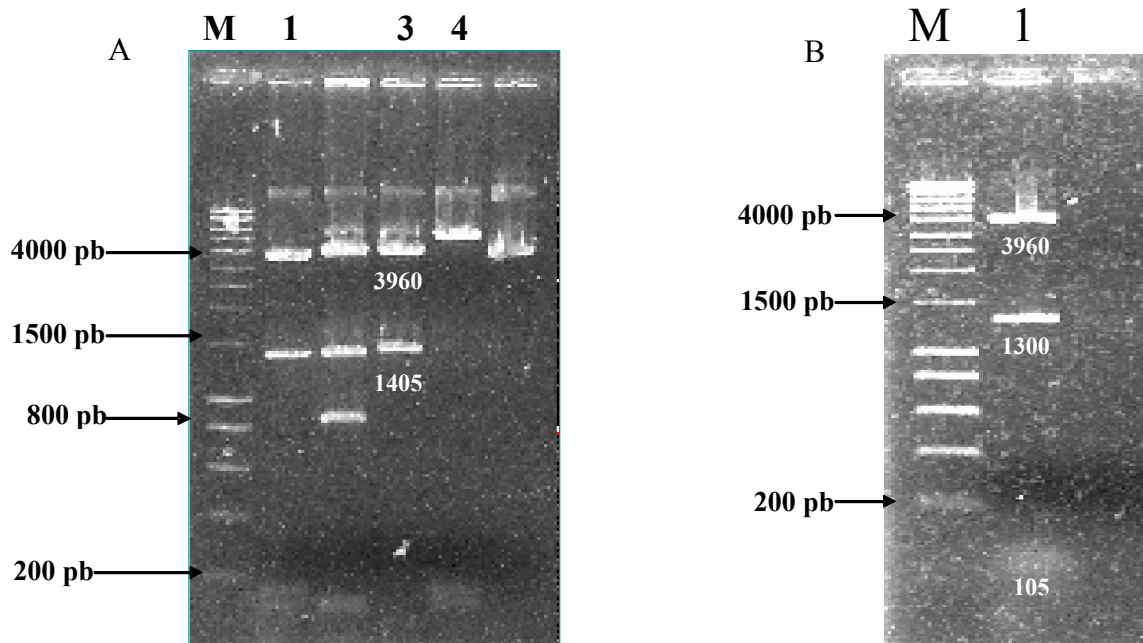
### 3. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE REACCIÓN DE RESTRICIÓN DEL VECTOR *TOPO FI*

Se realizó la reacción de ligación del vector TOPO TA Cloning junto con el fragmento *FI*, seguida del protocolo de transformación. Una vez se obtuvo el vector de clonación intermedio Topo *FI*, se caracterizó mediante dos dobles cortes, asegurando que la construcción obtenida coincidiera con la diseñada.

En la Fig. 20A, se muestra la caracterización del vector topo *F1* mediante la digestión con la enzima de restricción *XhoI*. En el carril 3 se observa la presencia de dos bandas, una de un tamaño de 3960 pb y otra banda de 1405 pb. Este perfil correspondía con el patrón esperado según la estrategia (Fig 19a). En la Fig 20B, se muestra la caracterización del mismo topo utilizando las enzimas de restricción *XhoI* y *SacII*, obteniéndose en este caso tres bandas: una de 3960 pb, una segunda banda de 1300 pb y una tercera de 105 pb que igualmente se correspondieron con el patrón de restricción esperado.



**Fig. 19** (19a izquierda, 19b derecha) Modelo teórico de la reacción de restricción para el fragmento *F1*.

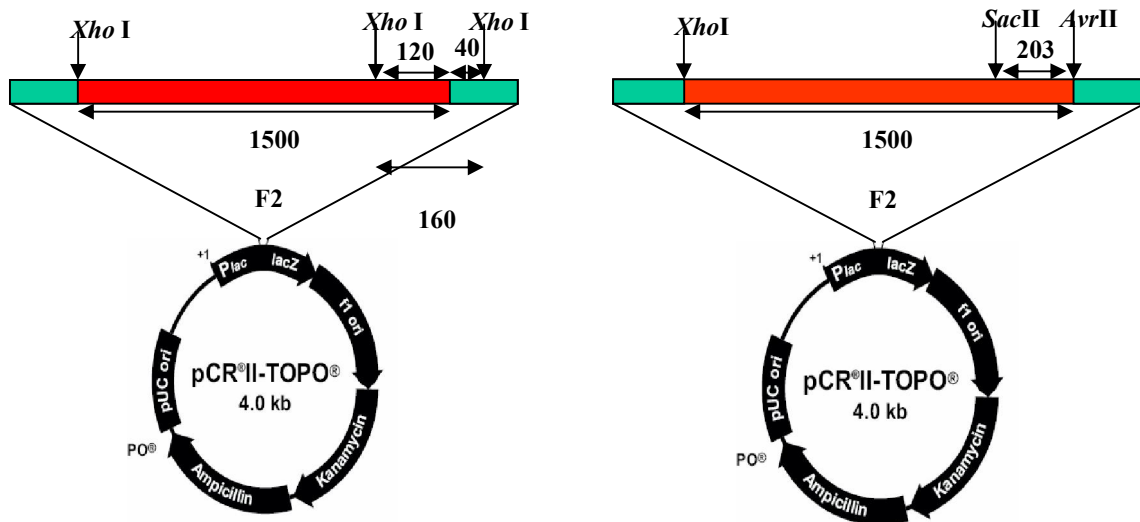


**Figura 20A.** Fragmentos liberados del vector Topo *FI* mediante la utilización del enzima *XhoI*. El gel de agarosa se concentró al 0.9% y teñido con bromuro de etidio. **Figura 20B.** Fragmentos liberados del vector Topo *FI* mediante la utilización de las enzimas de restricción *XhoI* y *SacII*. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 0.9%.

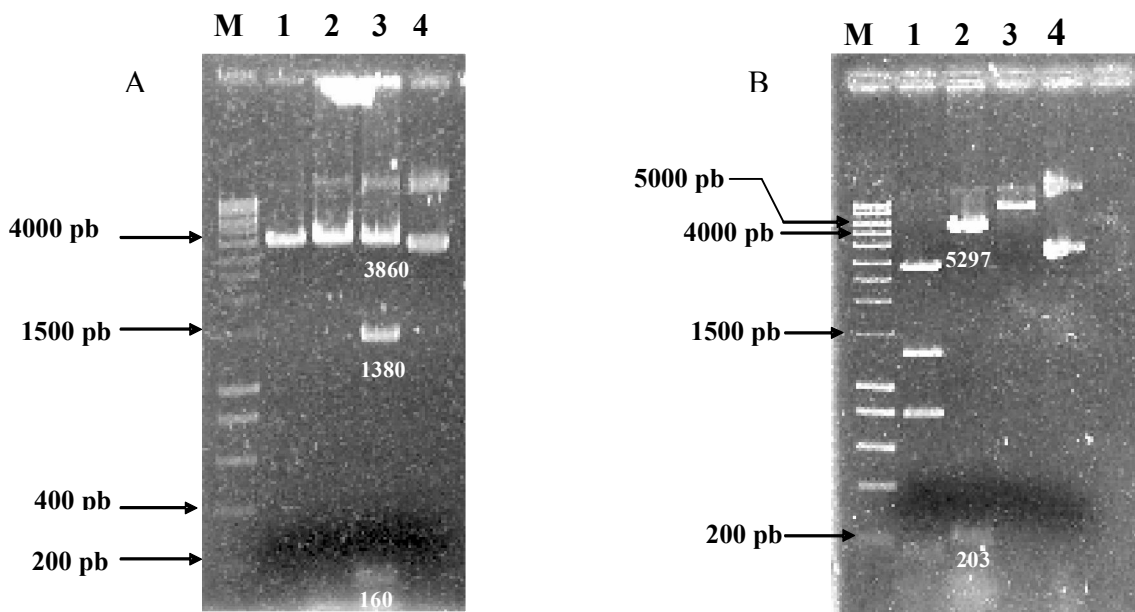
#### 4. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE REACCIÓN DE RESTRICCIÓN DEL VECTOR *TOPO F2*

En este caso se siguió la misma metodología descrita para el vector Topo *FI*, con la diferencia de que el fragmento que se incluyó se obtuvo mediante la utilización de los oligonucleótidos 3LA y LD5 para la subsiguiente reacción de PCR. Seguidamente se procedió a la caracterización de dicho plásmido.

En la figura 22A se muestra el corte realizado con la enzima *XhoI* sobre el vector Topo *F2*. Ahí, se pueden observar tres bandas esperadas por el modelo, (fig. 21a): una de 3860 pb, una segunda banda de 1380 pb y una tercera banda de 160 pb. En la figura 22B, se realizó una reacción de restricción utilizando las enzimas *SacII* y *AvrII* y se observó la presencia de dos bandas: una banda de 5297 pb y otra banda de 203 pb. Ambas bandas previstas por el modelo (Fig 21b).



**Figura 21 (21a izquierda, 21b derecha)** Modelo teórico previsto para la reacción de restricción del vector Topo *FII*. Con las enzimas *Xho I*, en la parte izquierda, y los modelos *Sac II* *Avr II* en la parte derecha



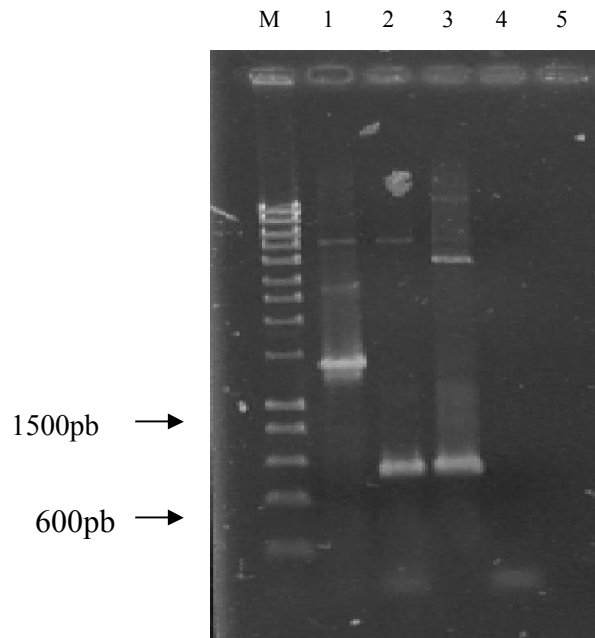
**Figura 22A.** Fragmentos liberados del vector Topo *FII* mediante la utilización del enzima *XhoI*. (Carril 3) El proceso electroforético se realizó en un gel de agarosa al 0.9% y teñido con bromuro de etidio. **Figura 22B.** Fragmentos liberados del vector Topo *FII* mediante las enzimas de restricción *SacII* y *AvrII*. (Carril 2). La electroforesis se realizó en un gel de agarosa concentrado al 0.9%.

## 5. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE PCR DE LOS VECTORES TOPO *F1* Y *F2*

A continuación se muestra el resultado de la electroforesis donde se revelaron las muestras que fueron sometidas a amplificación específica con los oligonucleótidos



5LX1-LI3, para el caso del vector Topo *F1*, y los oligonucleótidos LD5-3LA, para el caso del vector Topo *F2* (fig.23). En ambas PCR se observó una única banda específica, correspondiente a lo esperado. Ambas amplificaciones se corrieron con sus correspondientes controles negativos.



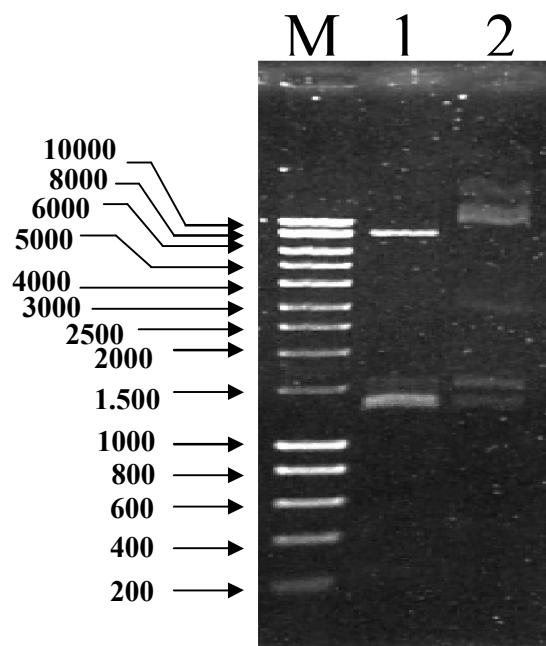
**Figura 23.** Fragmentos amplificados, mediante PCR, en el DNA plasmídico de los vectores Topo *F1* y Topo *F2*, utilizando en el carril 1 los cebadores 5LX1/3LI. En el carril 4 el control negativo de esta reacción de amplificación. En el carril 2 se utilizó los cebadores 3LA/LD5. Y en el carril 5 el control negativo correspondiente a la reacción de amplificación anterior. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 0.9%.

## 6. REACCIÓN DE LIGACIÓN PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR

### pPIC9Lac

En la reacción de ligación se utilizaron tres fragmentos (fig. 24): fragmento de 8.000 pb correspondiente a la parte reguladora del plásmido pPIC9HGH (Donde previamente fue eliminada la parte correspondiente al gen HGH mediante doble corte con las enzimas *XhoI* y *AvrII*), fragmento de 1.300 pb correspondiente al fragmento *F1*, que contiene la secuencia de cDNA correspondiente al péptido señal y la parte codificante del gen *LACI* hasta el sitio de restricción *SacII*. Y el fragmento de 200 pb

procedente del amplicón *FII* obtenido mediante doble restricción *SacII* – *AvrII* que contiene la parte de cDNA del gen *lacI* desde el sitio de restricción *SacII* hasta el sitio *AvrII*. En el carril 1 (fig. 24) tres bandas correspondientes a los tres fragmentos. En esta mezcla no se adicionó enzima ligasa, sirviendo este carril como control negativo. En el carril 2 se observa el resultado de la reacción con la adición de enzima ligasa, encontrando una banda en la parte superior del gel, correspondiente al plásmido de reciente formación circularizado. De igual manera, se pueden visualizar bandas de diferentes tamaños, correspondientes a secuencias que son múltiplos de las posibles combinaciones que se pueden producir en esta reacción.



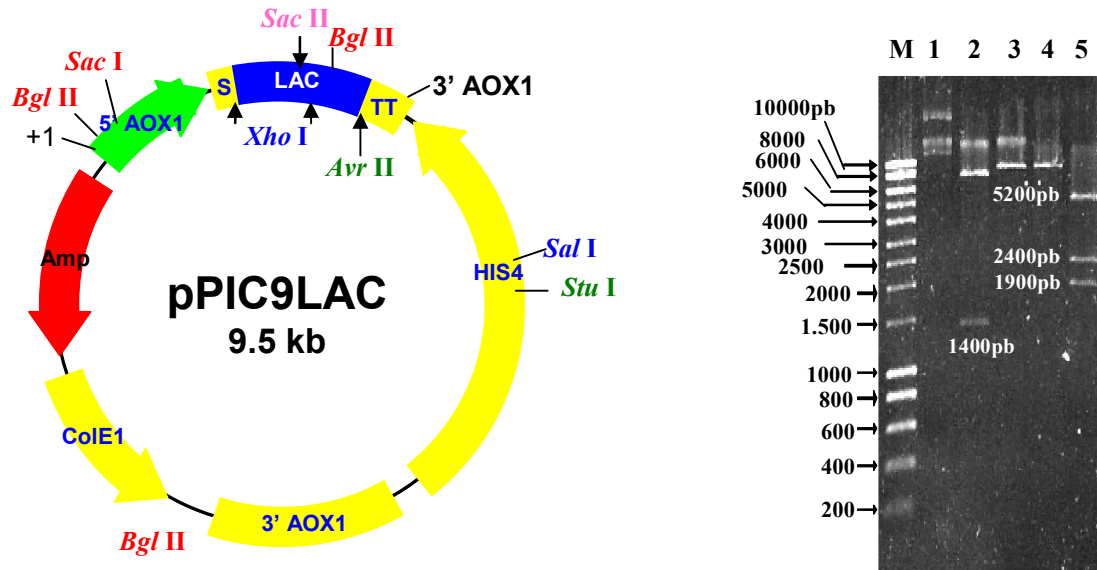
**Figura 24.** Fragmentos incluidos en la reacción de ligación. En el carril 1 se localiza el control de la reacción sin enzima ligasa. En el carril 2 se visualiza la reacción de ligación con ligasa. La electroforesis se corrió en un gel de agarosa al 0.9%.

## 7. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO

### pPIC9Lac

El plásmido obtenido tras la reacción de ligación se sometió a digestión con las enzimas de restricción *XhoI*, *SacII*, *AvrII*, y *BglII*, obteniéndose los patrones de restricción esperados según el modelo (fig. 25). Para el caso de *XhoI* encontramos dos bandas, una de 1400 pb y otra de 9100 pb. Para *SacII* encontramos una sola banda,

correspondiente al plásmido lineal, al igual que para el caso de *AvrII*. Para el caso de *BglIII* se encontraron tres bandas. Una de 5200 pb, una segunda banda de 2400 pb y una tercera banda de 1900 pb.

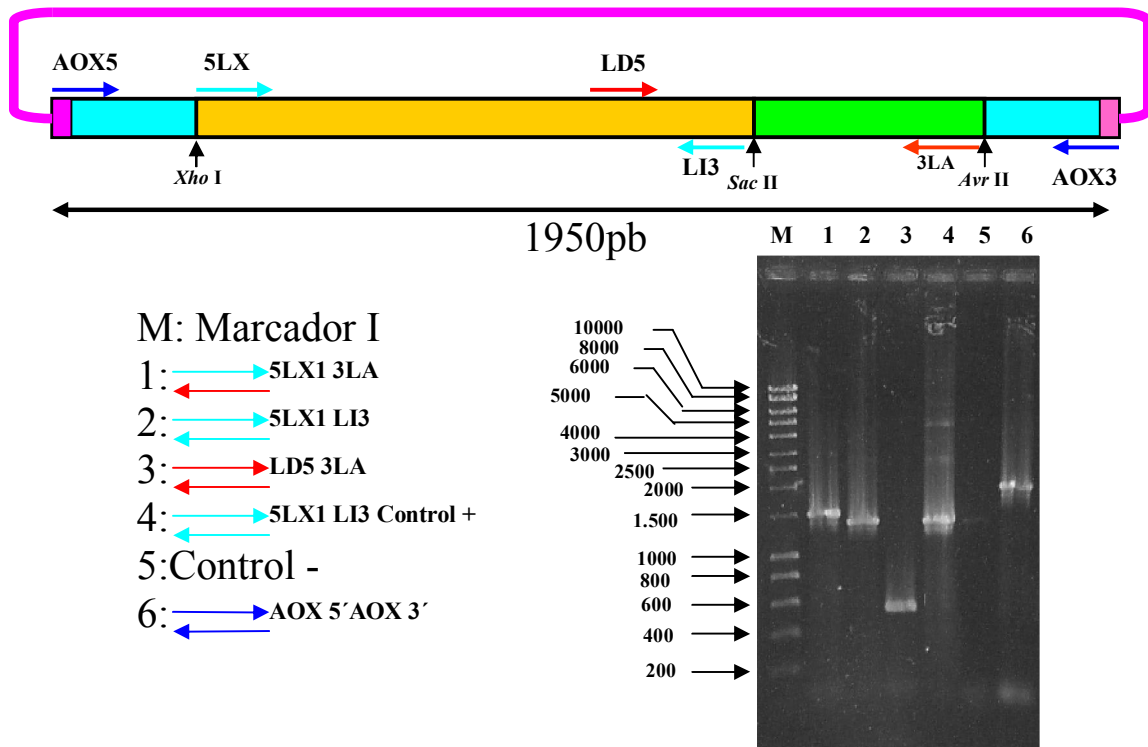


**Figura 25.** Fragmentos liberados del vector pPIC9Lac mediante las siguientes combinaciones enzimáticas para la restricción: Carril 1 control de digestión sin enzima. Carril 2 uso de la enzima *XhoI*. Carril 3 uso de la enzima *SacII*. Carril 4 uso de la enzima *AvrII*. Carril 5 uso de la enzima *BglIII*. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 0.9%. El marcador de peso molecular utilizado fue el Hyperlader I. En la parte izquierda de la figura está representado el plásmido con los sitios teóricos para el corte con las enzimas de restricción, correspondiéndose el diseño teórico con las bandas liberadas del plásmido construido.

## 8. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

### pPIC9lac

Una vez que el plásmido pPIC9lac, fue caracterizado por restricción, se procedió a la caracterización por amplificación. De esta manera, se contaba con dos pruebas que confirmasen la correcta construcción del vector. La reacción de amplificación se diseñó para que coincidiese con el modelo previsto, y que se pueden visualizar en el esquema de la figura 26. En la figura se muestran 6 amplificaciones específicas que confirman la construcción. En cada carril se observa una banda específica correspondiente a la longitud del amplicón esperado.



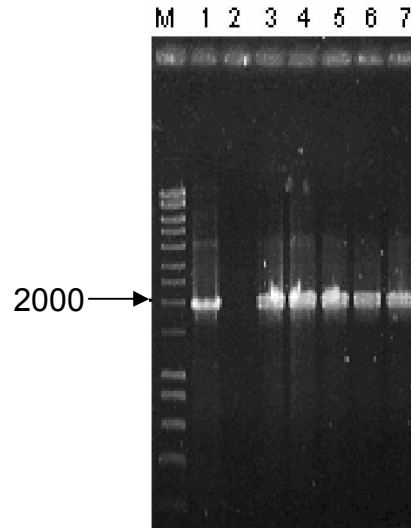
**Figura 26.** Fragmentos amplificados, mediante PCR, sobre el plásmido pPIC9Lac, mediante la utilización de diferentes cebadores. En el carril 1 se utilizaron los cebadores 5LX1/3LA. En el carril 2, los cebadores 5LX1/LI3. En el carril 3, los cebadores 3LA/LD5. En el carril 4 se utilizaron los cebadores 5LX1/LI3 (control positivo). En el carril 5, los cebadores 5LX1/3LA (control negativo). Y en el carril 6, los cebadores AOX5'/AOX3'. El proceso electroforético se llevó a cabo en un gel de agarosa al 0.9%. En la parte superior de la figura está incorporado el modelo teórico propuesto para la caracterización por amplificación.

## 9. CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DEL GEN *lac1* DE *T. versicolor* EN EL DNAg DE *Pichia pastoris*

La última ratificación necesaria para corroborar que el gen *LAC1* de *T. versicolor* estaba insertado dentro del DNAg de las levaduras fue realizar la amplificación específica para este fragmento sobre el DNA de las levaduras transformantes (fig. 27).

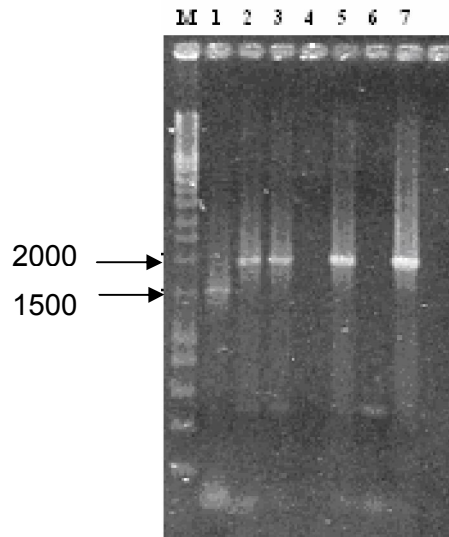
La presión de selección que se utilizó para aislar a los transformantes fue la capacidad de éstas de crecer en medios deficientes en histidina, los transformantes solo serían capaces de crecer si tuvieran el gen que complementara la ruta de biosíntesis de este aminoácido, el cual estaba inserto dentro de la secuencia del vector pPIC9. En la amplificación realizada sobre las cepas GS115 se esperaban dos bandas de un tamaño de 2050 pb y 1950 pb respectivamente. La primera corresponde a la longitud del gen de

la Alcohol oxidasa nativo (*AOX1*) en esta cepa, que mantiene una copia intacta. La segunda banda corresponde a la longitud del gen insertado, más 450 pb añadidas, correspondientes a los fragmentos flanqueantes del gen *AOX*, sumando un total cercano a 2000 pb.



**Figura 27.** Fragmentos amplificados mediante PCR sobre el DNAg de las cepas GS115 de *P. pastoris* utilizando los siguientes cebadores. En el carril 1 se observa el control + con el plásmido pPIC9Lac y los cebadores AOX5'AOX3'. En el carril 2 se observa la reacción anterior con agua como control negativo. En el 3, DNAg de GS115 clon 1 y cebadores AOX5'AOX3'. En el carril 4, DNAg de GS115 clon 2 y cebadores AOX5'AOX3'. En el carril 5 DNAg de GS115 clon 3 y cebadores AOX5'AOX3'. En el carril 6, DNAg de GS115 clon 4 y cebadores AOX5'AOX3'. Y en el carril 7 DNAg de GS115 clon 5 y cebadores AOX5'AOX3'. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 0.8%.

En la siguiente figura (fig 28) se muestra la amplificación específica sobre el DNAg de *P. pastoris* (Cepa KM71) utilizando los cebadores específicos para el fragmento correspondiente al cDNA de lacasa. En este caso se debería visualizar una banda de 1500 pb. Asimismo, también se muestra el resultado del mismo experimento citado en la figura 27 (amplificando con los oligonucleótidos AOX5'y AOX3'), en el cual sólo debe aparecer una banda, correspondiente a la longitud del gen *lacI* (1950 pb).



**Figura 28.** Fragmentos amplificados mediante PCR sobre el DNAg de las cepas KM71 de *P. pastoris* utilizando diferentes cebadores. En el carril **1**, se observa el DNAg de GS115 1 y los cebadores 5LX1-3LA. En el carril **2**, DNAg de KM71 clon 1 y cebadores AOX5'AOX3'. En el **3**, DNAg de KM71 clon 2 y cebadores AOX5'AOX3'. En el carril **5** DNAg de KM71 clon 3 y cebadores AOX5'AOX3'. En el carril **6**, agua y cebadores AOX5'AOX3' control negativo. Y en el carril **7**, pPIC9Lac y cebadores AOX5'AOX3' control positivo. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 0.9%.

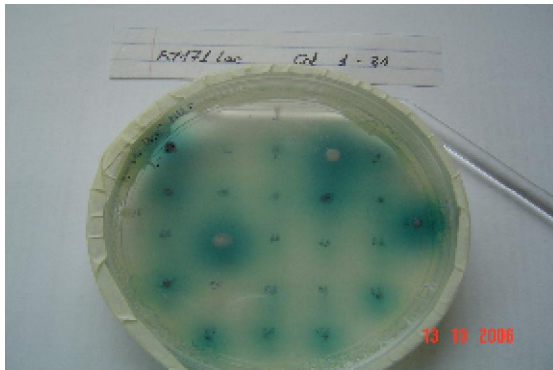
## 10. SELECCIÓN DE CLONES TRANSFORMANTES

Después de confirmar la presencia del gen *lacI* en el DNAg de *P. pastoris*, se procedió a realizar una selección de los mejores clones. Tras una primera fase de construcción de la cepa recombinante, se realizó una selección de cepas capaces de crecer en medio RBD His<sup>-</sup>. Una vez se incubó esta placa, se llevó a cabo la numeración de las colonias de mayor tamaño, al mismo tiempo que se les asignó una clave de identificación.

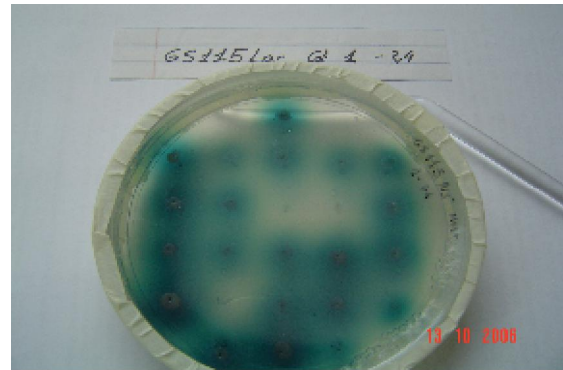
Una vez se tuvo todas las colonias replicadas en placas nuevas, se sembraron sobre medio BMM sólido, agregando ABTS hasta alcanzar una concentración de 0.2 mM, CuSO<sub>4</sub> 2 mM, la correspondiente cantidad de biotina, y una concentración de metanol de 0.1%, (v/v).

Tras una incubación durante 48 horas, se observó un halo de color verde alrededor de las colonias (fig. 29). Esta coloración se produjo debido a la oxidación del

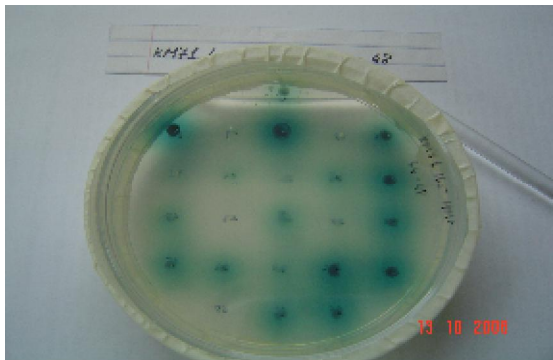
ABTS por la acción de la enzima lacasa heteróloga, pudiéndose identificar visualmente, las colonias que poseían mayor actividad lacasa.



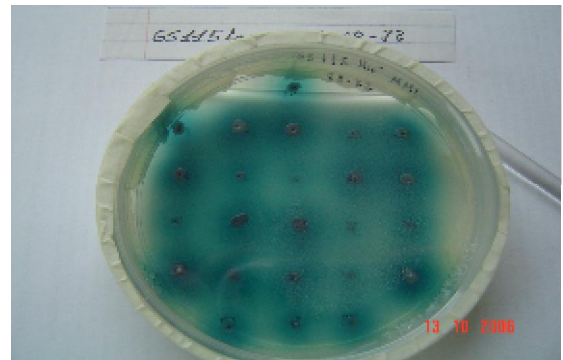
KM71 1-24



GS 115 1-24

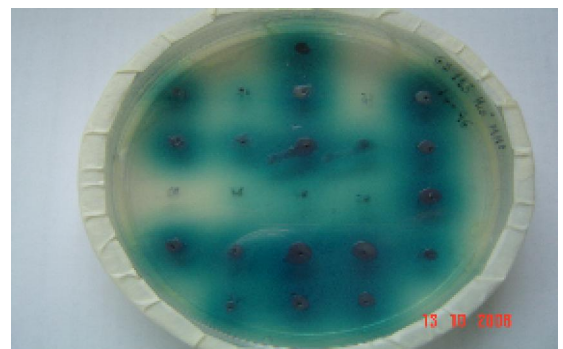


KM71 24-48



GS 115 48-72

**Figura. 29** Placas His<sup>-</sup> con ABTS y CuSO<sub>4</sub> para la selección de los transformantes. La intensidad y las dimensiones del halo verde son los clones que *a priori* mayor expresión heteróloga presentaron. Debajo de cada placa se muestra el tipo de cepa con su número de colonia asociado.



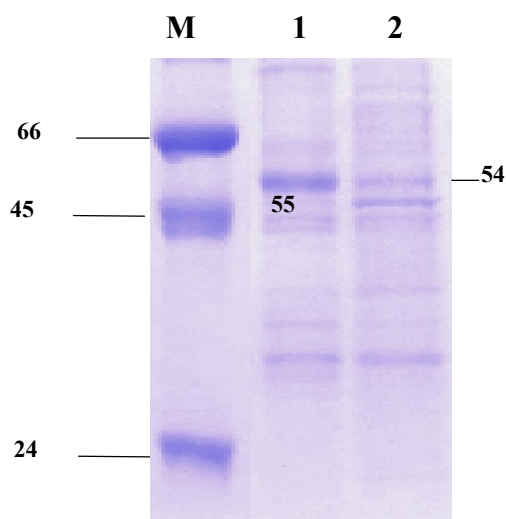
GS115 72-96

## 11. IDENTIFICACIÓN DE LA LACASA HETERÓLOGA EN EL SOBRENADANTE DE LA FERMENTACIÓN DE LOS CLONES TRANSFORMANTES.

Finalmente, la última prueba que se realizó para comprobar la correcta construcción genética inserta en las levaduras transformantes fue analizar en un gel de

poliacrilamida, las proteínas presentes en el medio de cultivo, tras llevar a cabo una fermentación con una de las transformantes obtenidas y someterlas a inducción con la adición de metanol en una proporción de 0.75% v/v.

Previo a este análisis se determinó que la proteína heteróloga debía tener un peso aproximado de 55.000 Da, teniendo en cuenta el peso medio que aporta cada aminoácido, el grado de glicosilación y la longitud de la lacasa. Los resultados se muestran en la Fig (30).



**Figura 30.** En la figura se muestra las proteínas presentes en el sobrenadante de la cepa GS115 (clon 4), (carril 1) y KM71 (clon 1) (carril 2).

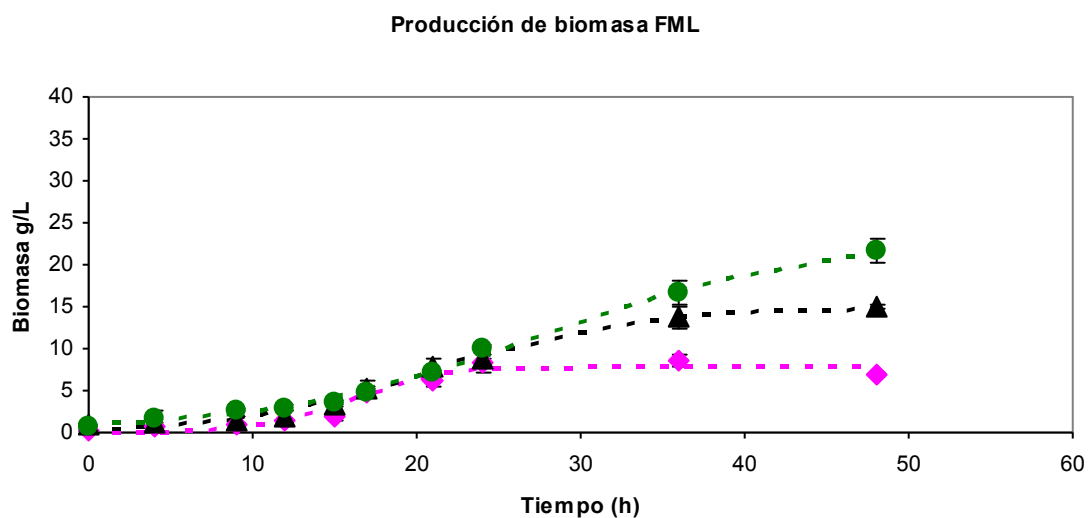
## **12. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA GS115 (CLON 55) EN CONDICIONES DE RELACIÓN C/N NO BALANCEADAS**

La cepa GS115 se cultivó en matraces Erlenmeyer en dos sistemas de fermentación diferentes. FML y FMS, en los cuales el glicerol fue incorporado en concentraciones crecientes mientras que la fuente de nitrógeno  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se adicionó en cantidad constante.

### **12.1. Cinética de crecimiento de la cepa GS115Lac en FML**

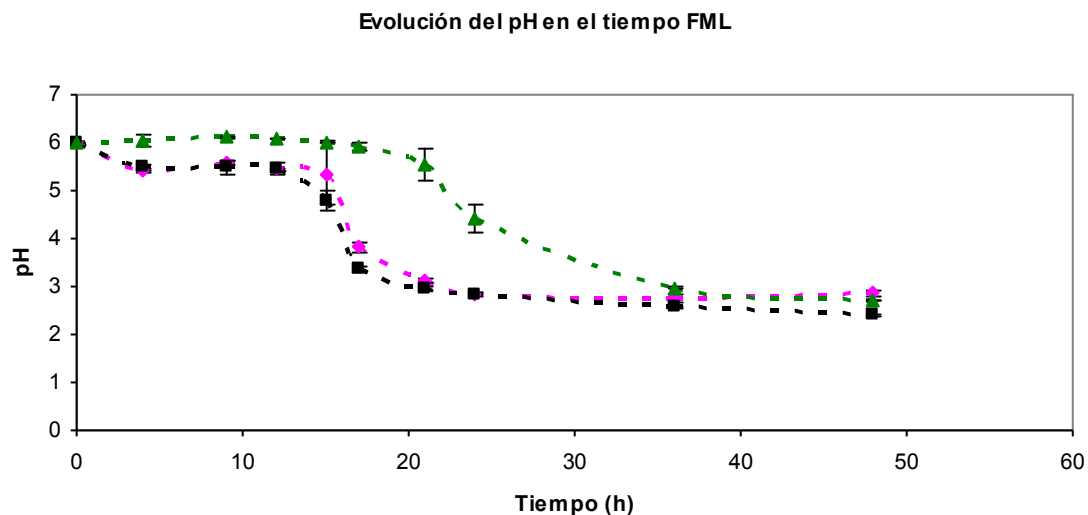


Las fermentaciones se realizaron como se describe en la sección 2.5 y 13 de materiales y métodos. La cinética se prolongó durante 48 horas. El monitoreo del proceso se realizó mediante 9 puntos de medición repartidos a lo largo de la fermentación, en los cuales se evaluó la biomasa como peso seco y el pH. Las cinéticas se repitieron por triplicado, y la concentración inicial de glicerol se fue incrementando desde los 12 a 100 g L<sup>-1</sup>, para el análisis de las posibles diferencias de los parámetros a estudiar. Asimismo, se decidió mantener constante la concentración inicial de sulfato amónico SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, utilizándose 5 g L<sup>-1</sup> en cada una de las fermentaciones. El modelo logístico que se visualiza en la figura 31, se realizó con la herramienta Solver del programa Excel (Microsoft office 2003). (Tlecuitl-Beristain y col., 2009)



**Figura 31.** Representación gráfica de la evolución del crecimiento de la biomasa en FML. En color **rosa** ◆, tenemos 12 g L<sup>-1</sup> de glicerol. En color **negro** ▲ 50 g L<sup>-1</sup>, en color **verde** ●, 100g L<sup>-1</sup>.

En la figura 32 se muestra el comportamiento del pH a lo largo de las cinéticas para las fermentaciones de la figura 31.



**Figura 32.** Evolución del pH en condiciones C/N no balanceadas. En color rosa  $\blacklozenge$ , tenemos el 12 g L<sup>-1</sup> de glicerol. En color negro  $\blacktriangle$  50 g L<sup>-1</sup>, en color verde  $\bullet$ , 100 g L<sup>-1</sup>.

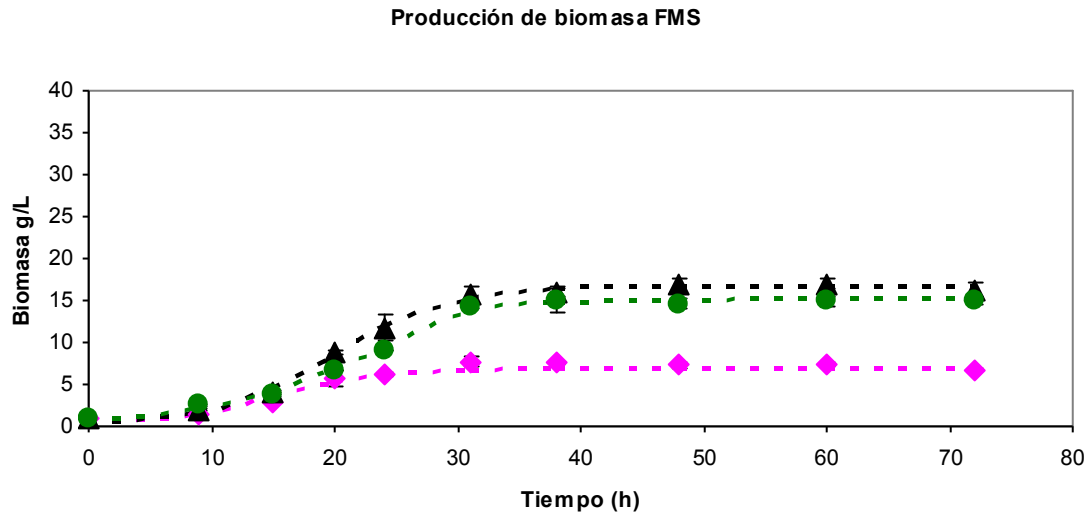
Los valores referentes a los cocientes C/N resultantes de la composición de estos medios se utilizaron para fermentaciones SmF y SSF y se muestran en la tabla 2.

|  |      |      |      |
|--|------|------|------|
| <b>Glicerol g L<sup>-1</sup></b>                                   | 12   | 48   | 96   |
| <b>SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> g L<sup>-1</sup></b> | 5    | 5    | 5    |
| <b>Valor C/N</b>   | 4.41 | 17.3 | 35.7 |

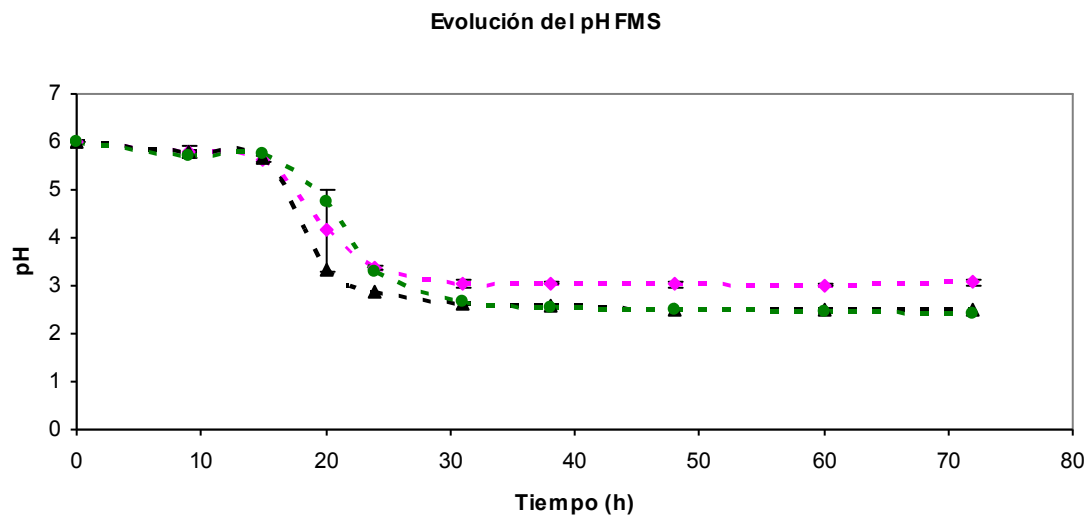
**Tabla 2.** La tabla muestra las cantidades de glicerol que se adicionaron en cada uno de los medios utilizados así como la relación C/N que resultó. Medios utilizados en FML y FMS

### 12.2. Cinética de crecimiento de la cepa GS115Lac en FMS

En las mismas condiciones descritas para las anteriores fermentaciones, se repitió el experimento utilizando espuma de poliuretano como soporte sólido. La evolución en el tiempo de la biomasa se muestra en la figura 33, mientras que el comportamiento del pH en estas condiciones se visualiza en la figura 34.



**Figura 33** Representación gráfica de la evolución del crecimiento de la biomasa en FMS. En color rosa ◆, tenemos el 12 g L<sup>-1</sup> de glicerol. En color negro ▲ 50 g L<sup>-1</sup>, en color verde ●, 100 g L<sup>-1</sup>.

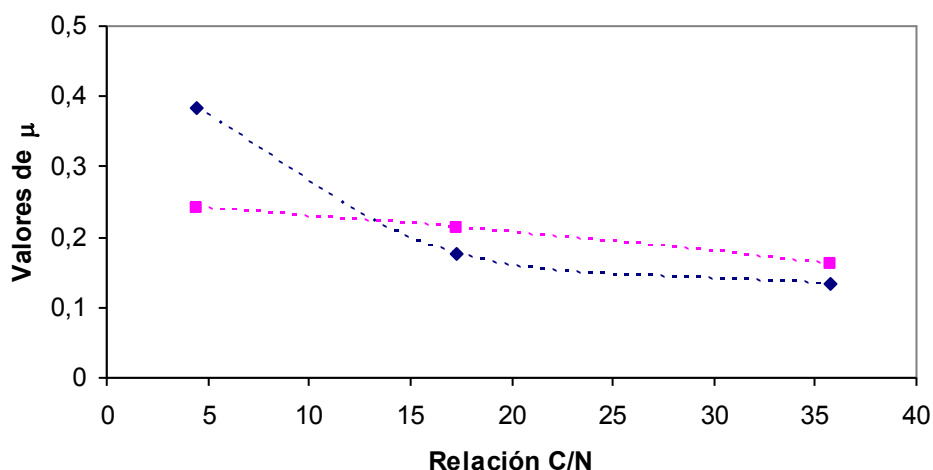


**Figura 34.** Evolución del pH en condiciones C/N no balanceadas. En color rosa ◆, tenemos el 12 g L<sup>-1</sup> de glicerol. En color negro ▲ 50 g L<sup>-1</sup>, en color verde ●, 100 g L<sup>-1</sup>.

### 12.3. Evaluación del efecto de la variación del cociente C/N sobre la variable $\mu$ bajo las condiciones de los experimentos de los apartados 12.1 y 12.2

La tasa de crecimiento  $\mu$  fue medida en cada una de las cinéticas (FML, FMS). La relación C/N incrementa su valor a medida que la cantidad de glicerol aumenta en el medio al mantenerse constante la cantidad de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . La figura 35 muestra la

variación que experimenta la variable  $\mu$  a diferentes cocientes C/N y en ambos soportes de fermentación. (Fig. 35)



**Figura 35.** Valores de  $\mu$  a diferentes valores C/N. Los puntos en color rosa ■ corresponden a las FMS y los puntos en azul ♦ corresponden a las FML.

### 13. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO EN EL CRECIMIENTO Y LA EVOLUCIÓN DEL PH EN FML Y FMS.

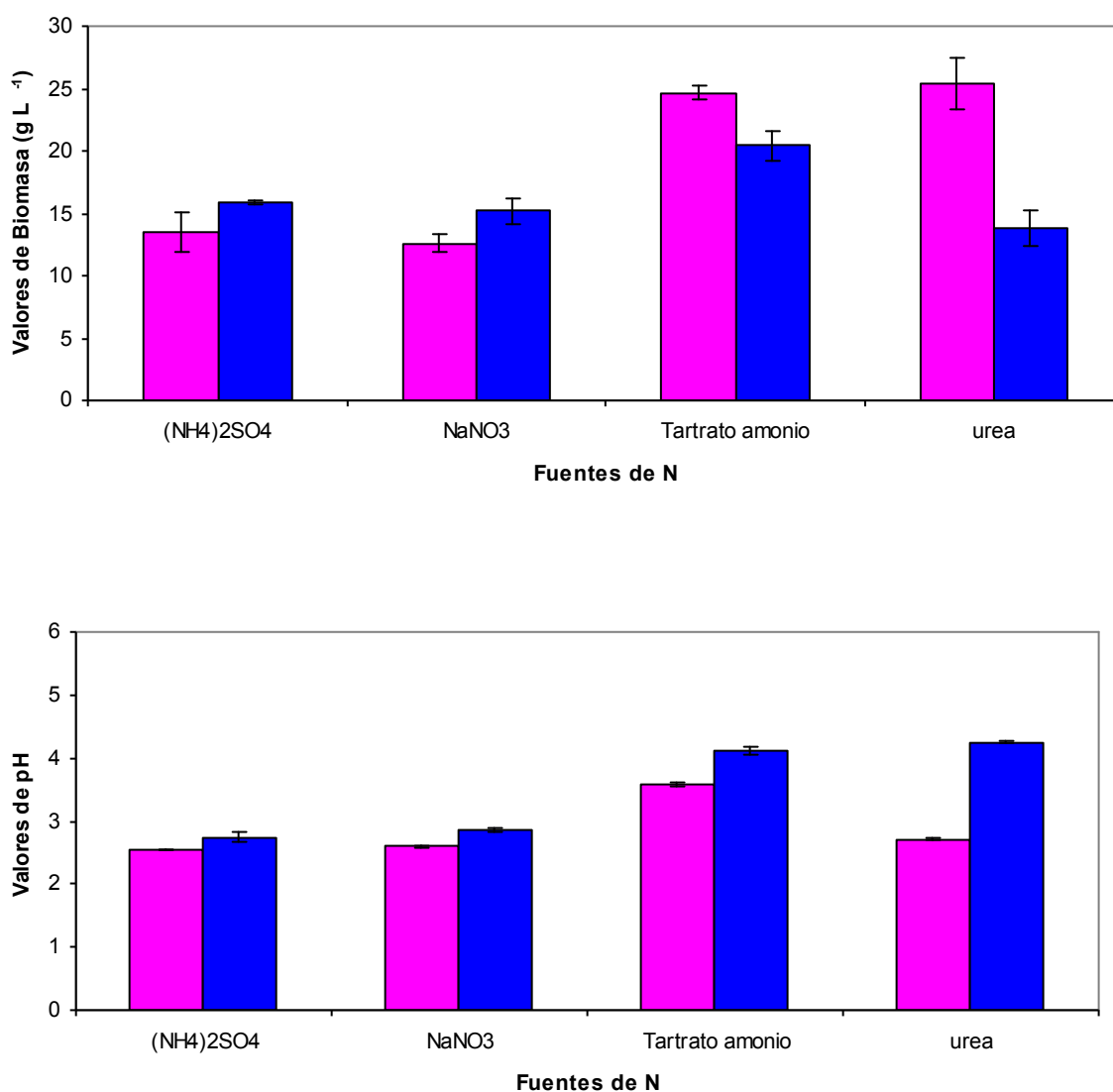
Se realizaron cuatro cinéticas en FML y FMS, utilizándose la cepa GS115 y dándose cuatro fuentes de nitrógeno diferentes. Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ), sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , urea y tartrato de amonio. Utilizando el medio y la metodología descrita en la sección 2.5. y 13 de materiales y métodos.. Las fermentaciones se prolongaron durante 48 horas, midiéndose la cantidad de biomasa y el pH. Las cinéticas se realizaron por triplicado, utilizando la misma metodología que las descritas en las secciones 2.5 y 13 de materiales y métodos. La concentración inicial de glicerol fue de  $90.4 \text{ g L}^{-1}$ . La composición de cada uno de los medios de muestra en la tabla 3.

| Compuesto                    | FMS/L1 ( $\text{g L}^{-1}$ ) | FMS/L2( $\text{g L}^{-1}$ ) | FMS/L3( $\text{g L}^{-1}$ ) | FMS/L4( $\text{g L}^{-1}$ ) | C/N   |
|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------|
| YNB                          | 13.6                         | 13.6                        | 13.6                        | 13.6                        | -     |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 5.09                         | -                           | -                           | -                           | 18.21 |
| $\text{NaNO}_3$              | -                            | 6.52                        | -                           | -                           | 18.21 |
| Tartrato                     | -                            | -                           | 7.03                        | -                           | 18.21 |
| Urea                         | -                            | -                           | -                           | 2.32                        | 18.21 |

|                          |                       |                       |                       |                       |   |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| Biotina                  | $4 \times 10^{-5} \%$ | $4 \times 10^{-5} \%$ | $4 \times 10^{-5} \%$ | $4 \times 10^{-5} \%$ | - |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 11.8                  | 11.8                  | 11.8                  | 11.8                  | - |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ | 2.29                  | 2.29                  | 2.29                  | 2.29                  | - |
| Glicerol                 | 90.4                  | 90.4                  | 88.72                 | 90.4                  | - |

**Tabla 3.** Composición de los medios de cultivo utilizados en las condiciones experimentales descritas en el apartado 13

El objetivo de este experimento fue dilucidar el medio que maximizaba las diferencias entre los soportes FML y FMS, al mismo tiempo que permitía que los valores de pH no inhibieran el crecimiento celular. En la figura 36 se muestran los resultados encontrados.



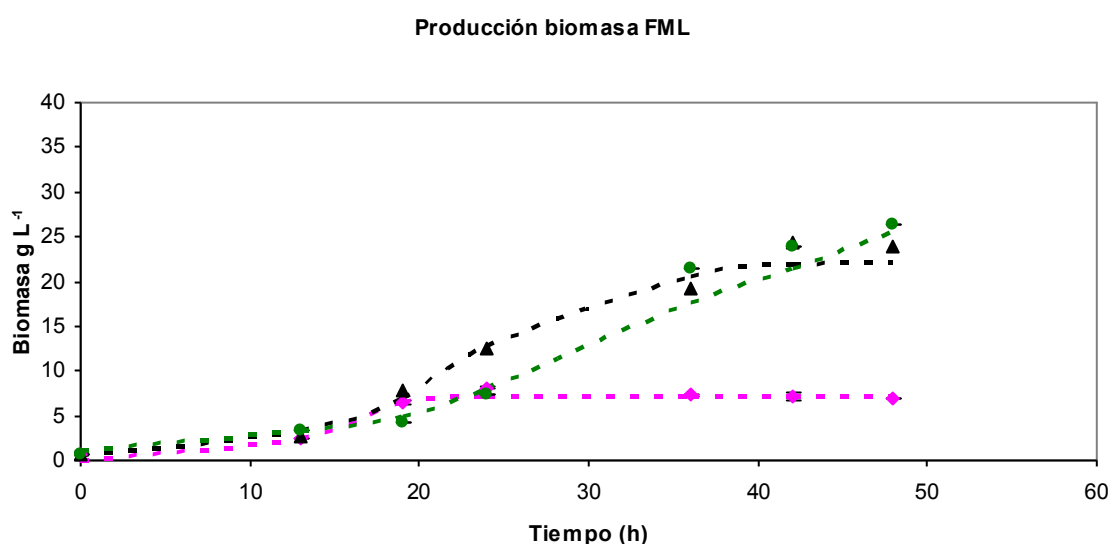
**Figura 36.** En el gráfico de barras superior se muestran los resultados correspondientes a la producción de biomasa (Los resultados correspondientes a FML se ilustran en color azul, mientras que

los correspondientes a FMS están de color rosa. En la gráfica inferior se muestran los resultados correspondientes a los valores de pH encontrados bajo estas condiciones de ensayo. También en este caso, los datos para FML están en color azul y los datos para FMS figuran de color rosa.

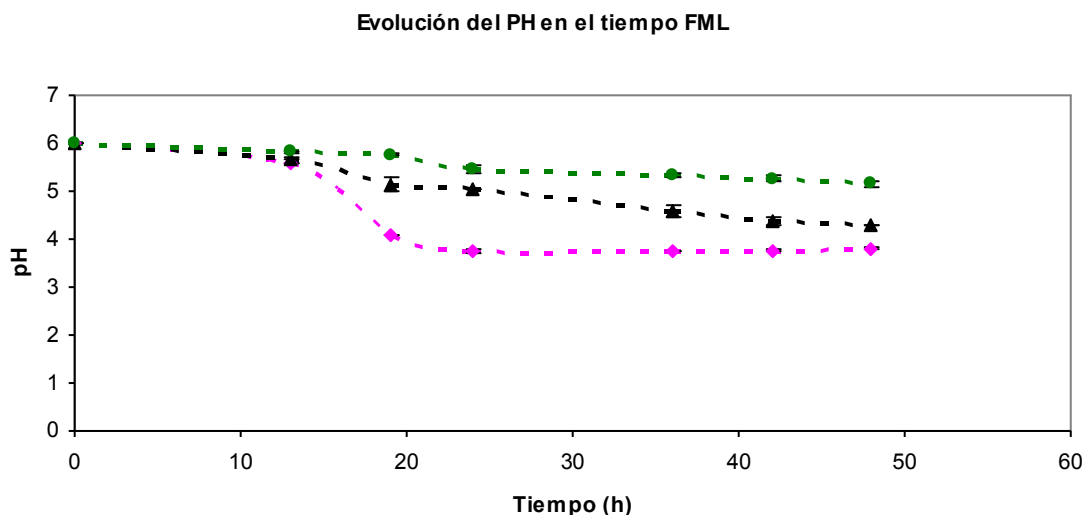
Tras la finalización de este experimento, se seleccionó el medio con tartrato amónico. La urea fue rechazada como fuente de nitrógeno óptima por sus posibles efectos negativos sobre la actividad enzimática lacasa (Chang y Raymond, 1997).

#### 14. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA GS115Lac EN MEDIOS CON COCIENTE C/N BALANCEADO.

Una vez exploradas las condiciones de fermentación descritas en el apartado 12 de resultados, se procedió a realizar las cinéticas en FMS y FML utilizando medios con relación C/N balanceada en un valor de 9.3, (finalmente se utilizó esta relación C/N por los resultados preliminares obtenidos repitiendo el mismo experimento con la hipótesis de que esta relación funcionaría mejor, estos resultados no se muestran) utilizando tartrato amónico como fuente de nitrógeno y utilizando al mismo tiempo este compuesto como agente amortiguador del pH. De manera preliminar se efectuaron cinéticas de crecimiento durante 48 h para comprobar las diferencias con las cinéticas donde la relación C/N no fue constante (Fig 37 a, b, c y d).



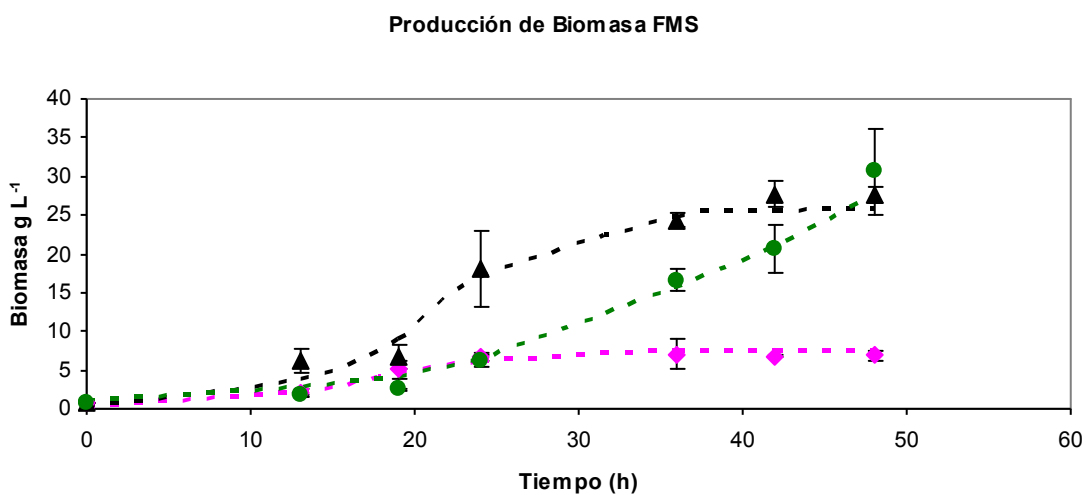
**Figura 37a** Representación gráfica de la evolución del crecimiento de la biomasa en FML. En color rosa ◆, cultivo con 9.03 g L<sup>-1</sup> de glicerol. En color negro ▲ 36.24 g L<sup>-1</sup>, en color verde ●, 90.4 g L<sup>-1</sup>.



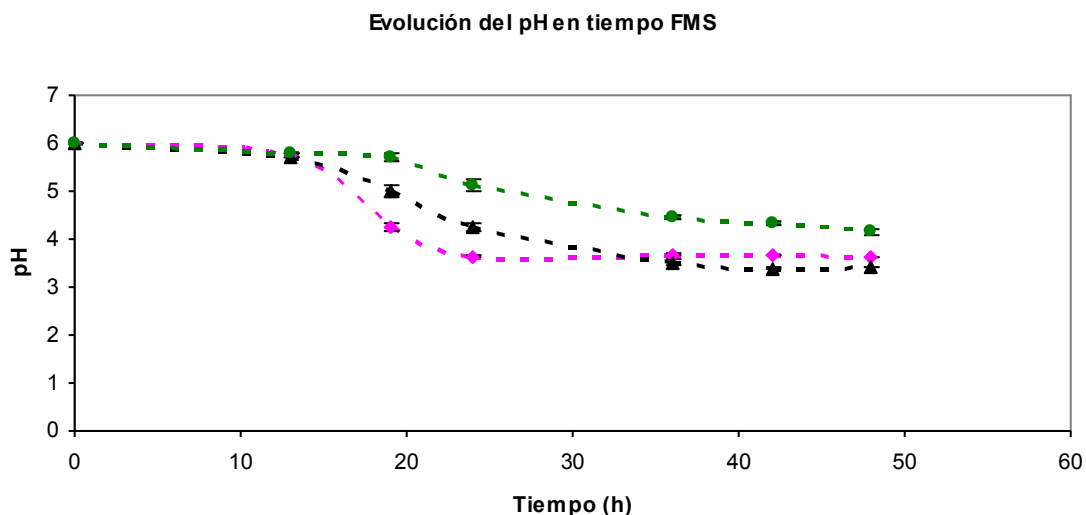
**Figura 37b.** Evolución del pH en condiciones C/N balanceadas. En color rosa ◆, cultivo con 9.03 g L<sup>-1</sup> de glicerol. En color negro ▲ 36.24 g L<sup>-1</sup>, en color verde ●, 90.4 g L<sup>-1</sup>.

|                                  |      |       |       |
|----------------------------------|------|-------|-------|
| <b>Glicerol g L<sup>-1</sup></b> | 9.03 | 36.24 | 90.4  |
| <b>Tartrato g L<sup>-1</sup></b> | 3.07 | 12.22 | 30.78 |
| <b>Valor C/N</b>                 | 9.3  | 9.3   | 9.3   |

**Tabla 4.** La tabla muestra las cantidades de glicerol y de tartrato de amonio que se adicionaron en cada uno de los medios utilizados así como la relación C/N que resultó. Descrito en el apartado 14. Medios utilizados en FML y FMS



**Figura 37c** Representación gráfica de la evolución del crecimiento de la biomasa en FMS. En color rosa ◆, cultivo con 9.032 g L<sup>-1</sup> de glicerol. En color negro ▲ 36.24 g L<sup>-1</sup>, en color verde ●, 90.4 g L<sup>-1</sup>.



**Figura 37d.** Evolución del pH en condiciones C/N balanceadas. En color rosa ◆, cultivo con el 9.03 g L<sup>-1</sup> de glicerol. En color negro ▲ 36.24 g L<sup>-1</sup>, en color verde ●, 90.4 g L<sup>-1</sup>.

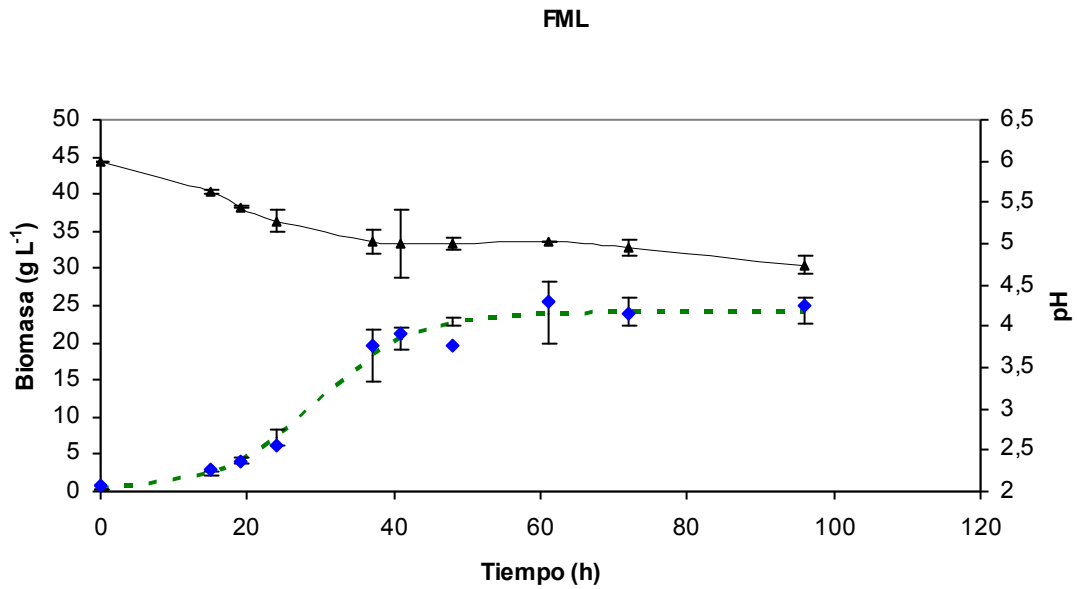
Estos experimentos demostraron que cuando la relación C/N se mantiene constante la cantidad de biomasa producida es mayor cuando se utilizan concentraciones de glicerol de 36.24 y 90.4 g L<sup>-1</sup>. Tanto en fermentaciones líquidas como en fermentaciones sólidas.

## 15. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE METANOL EN TIEMPO CERO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

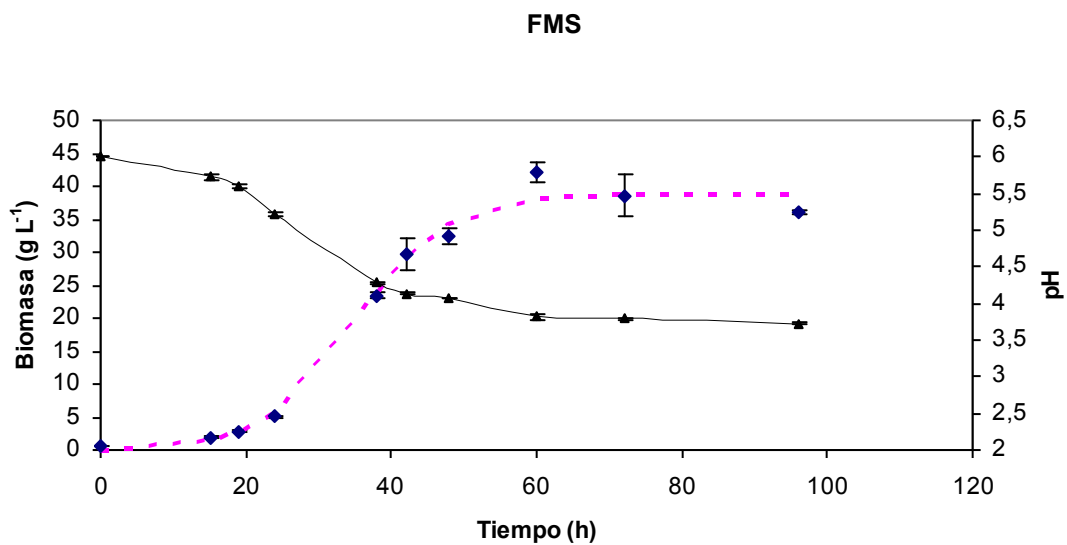
Una de las líneas de estudio que se siguieron en este trabajo consistió en analizar la actividad enzimática heteróloga asociada al crecimiento del cultivo. Para ello se diseñó una cinética en la cual el cultivo partía de una biomasa inicial cercana a cero (0.75 g L<sup>-1</sup>), y una gran cantidad de glicerol 90.4 g L<sup>-1</sup> incorporándose metanol al 1% en t = 0 (7.9 g L<sup>-1</sup>), (con el objetivo de analizar la expresión asociada al crecimiento). Las condiciones que se eligieron en este experimento, se debieron a que fueron aquellas en las cuales se encontraron mayores diferencias en cuanto a



generación de biomasa entre fermentaciones sólidos y líquidos. Hay que recordar que el metanol actúa como inductor del promotor *AOX1* que a su vez controla la expresión del gen *lacI* de *T. versicolor*. Las cinéticas se realizaron por triplicado manteniendo las condiciones de cultivo descritas en los apartados 2.5 y 13 de materiales y métodos. Los resultados referentes a estas cinéticas se muestran en la figuras 38 a y b.



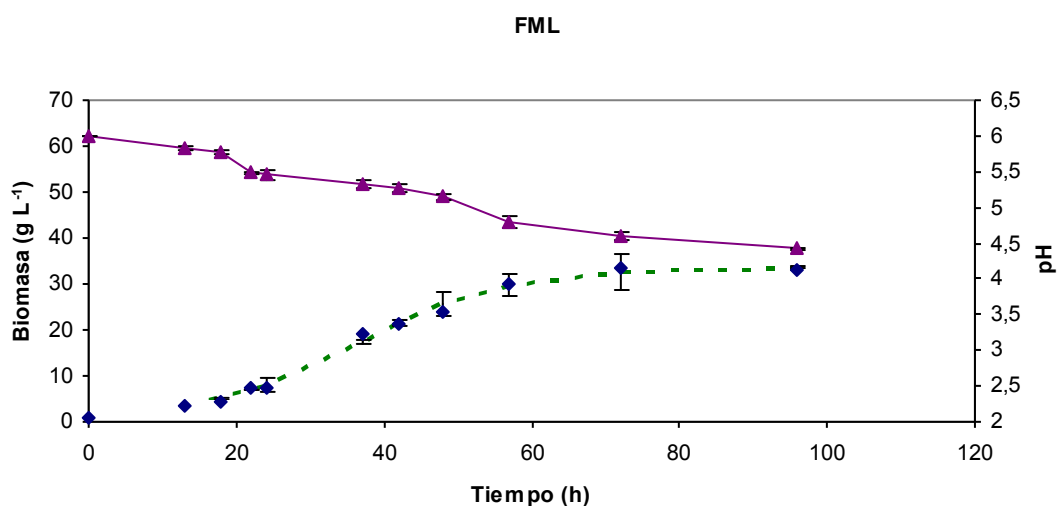
**Figura 38a.** Cinética correspondiente al crecimiento de la cepa GS115 clon 55 en FML. En esta cinética se utilizaron 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol y 7.9 g L<sup>-1</sup> de metanol



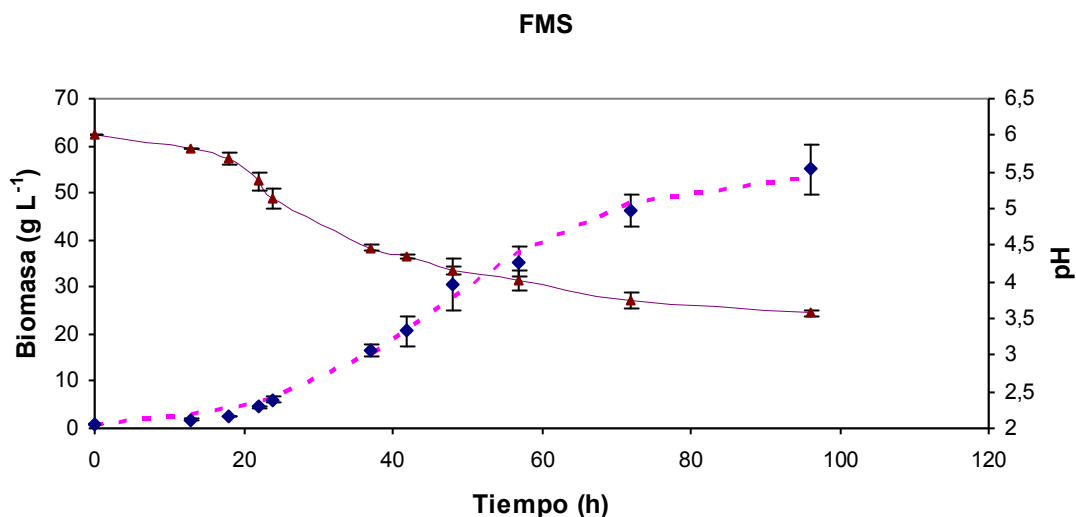
**Figura 38b.** Cinética correspondiente al crecimiento de la cepa GS115 clon 4 en FMS. En esta cinética se utilizaron 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol y 7.9 g L<sup>-1</sup> de metanol

Los datos relevantes de las fermentaciones se muestran en la tabla 5. Asimismo, es importante destacar el efecto tóxico que provoca el metanol en la producción de biomasa en ambos sistemas de cultivo (FML y FMS) comparados con la misma cinética en ausencia de metanol. Sin embargo es destacable el hecho de que las FMS son mejores productoras de biomasa.

Para poder establecer las comparativas correctamente, se realizaron dos fermentaciones adicionales, manteniendo las mismas condiciones descritas en el experimento anterior. Y con la diferencia de la ausencia de metanol durante toda la cinética. En la figura 39 a y b se muestran los resultados obtenidos tanto para biomasa como para pH.



**Figura 39a.** La gráfica muestra los valores de biomasa y pH alcanzados en las condiciones descritas para las fermentaciones sobre FML. En esta cinética se utilizó 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol.



**Figura 39b.** La gráfica ilustra los valores tanto de biomasa como de pH alcanzados en las condiciones descritas para la fermentación en FMS. En esta cinética se utilizó 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol.

En las FMS se encontró un pH al final de la fermentación de 3.57±0.03. En las fermentaciones FML se obtuvo un valor final de pH de 4.42±0.01, siendo esto un indicativo indirecto de la producción de biomasa diferencial en ambos sistemas de fermentación.

|                  | $\mu$              | $X_0$              | $X_{max}$          |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| FMS <sup>a</sup> | 0.161 <sup>a</sup> | 0.75 <sup>a</sup>  | 38.77 <sup>a</sup> |
| FML <sup>a</sup> | 0.151 <sup>a</sup> | 0.749 <sup>a</sup> | 24.25 <sup>a</sup> |
| FMS <sup>b</sup> | 0.084 <sup>b</sup> | 0.75 <sup>b</sup>  | 54.32 <sup>b</sup> |
| FML <sup>b</sup> | 0.098 <sup>b</sup> | 0.75 <sup>b</sup>  | 36.6 <sup>b</sup>  |

**Tabla 5.** Datos obtenidos en los experimentos descritos en el apartado 15. El superíndice **a** corresponde a los valores encontrados cuando el metanol fue incorporado desde el inicio de la fermentación. El superíndice **b** corresponde a los valores experimentales encontrados cuando no se adicionó metanol al medio.

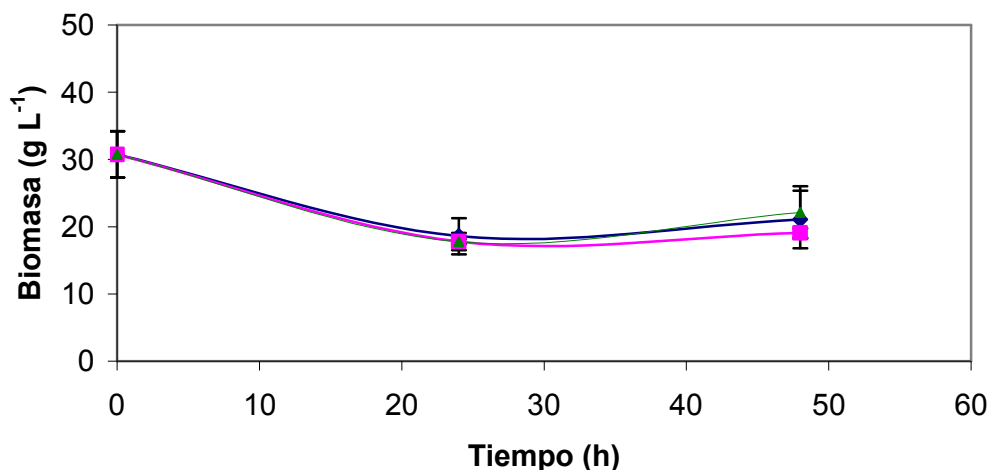
## 16. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE METANOL EN AUSENCIA DE GLICEROL, SOBRE LA BIOMASA Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### 16.1. Efecto sobre la biomasa

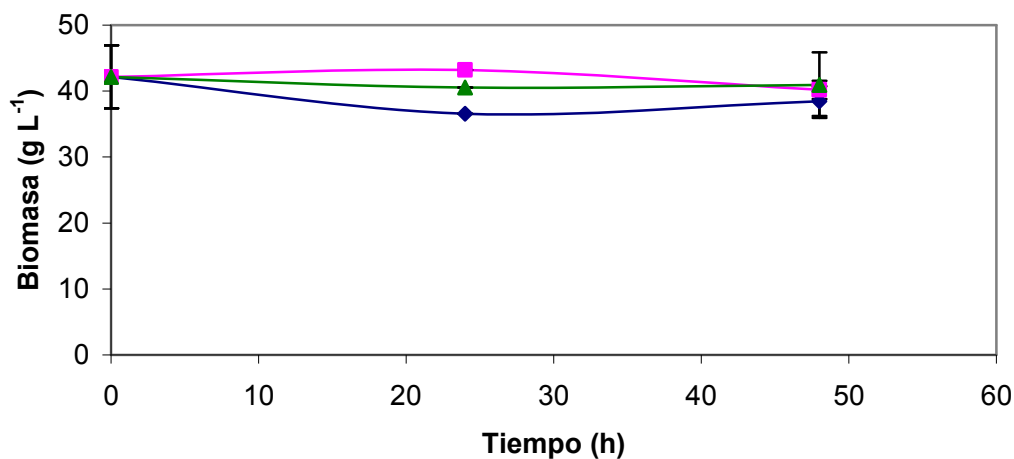
Teniendo en cuenta los resultados de anteriores, se diseñó un nuevo experimento en el que el metanol fue incorporado en una fase del cultivo donde la biomasa presente,

(capaz de utilizar el metanol como fuente de carbono y como inductor), fuera después lo suficientemente grande como para producir actividad lacasa detectable pasadas 48 horas de inducción. En este caso se mantuvieron las mismas condiciones experimentales que las descritas en el apartado 14 y se obtuvo un inóculo celular mediante el cultivo la cepa GS115 durante un periodo de 96 horas, tanto en FML como en FMS. Pasado este tiempo, se eliminó el medio BMG mediante centrifugación, con la intención de eliminar el glicerol remanente que pudiera ser causa de la represión del gen *lacI* bajo el control del promotor del gen *AOXI*. Asimismo, se utilizaron tres concentraciones diferentes de metanol para evaluar los efectos sobre la biomasa y la actividad enzimática, además de los posibles efectos de toxicidad generados sobre FML y FMS. Es importante señalar que los paquetes celulares recuperados de los soportes sólidos fueron incluidos en nuevos soportes sólidos estériles para proseguir con la siguiente fase del experimento, la que se refiere a la inducción (en condiciones de ausencia de glicerol). En la figura 40 se muestran los resultados correspondientes a los efectos del metanol sobre la biomasa en la fase de inducción de la expresión heteróloga. La toxicidad del metanol sobre la biomasa en FML fue mucho más acusada, alcanzando una lisis celular de hasta 43% en algunos casos mientras que en FMS se registra un máximo de 14% de lisis celular.

### Evolución de la biomasa en inducción sobre FML



### Evolución de la biomasa en inducción sobre FMS



**Figura 40** En el gráfico superior de la figura se muestran los resultados referentes a los datos de biomasa medidos en  $\text{g L}^{-1}$  de las FML. En la gráfica inferior se muestran los resultados referentes a las fermentaciones FMS. En color negro  $\blacklozenge$  datos referidos a  $7.9 \text{ g L}^{-1}$  MetOH, En color rosa  $\blacksquare$  ( $14.2 \text{ g L}^{-1}$  MetOH), en color verde  $\blacktriangle$  ( $31.6 \text{ g L}^{-1}$  MetOH).

### 16.2. Efecto sobre la actividad enzimática.

Fue detectada la actividad enzimática en este experimento, confirmándose que la presencia de glicerol en el medio en grandes cantidades es un factor inhibitor de la expresión del gen *lacI*, como ya ha sido reportado. (Cregg y col., 1993) La tabla 6 muestra los títulos enzimáticos encontrados en unidades por litro ( $\text{U L}^{-1}$ ).

| <b>MetOH (g L<sup>-1</sup>)</b> | <b>FMS</b>                                     | <b>FML</b>                                     |
|---------------------------------|--|--|
|                                 | <b>Actividad enzimática (U L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Actividad enzimática (U L<sup>-1</sup>)</b> |
| <b>0</b>                        | 0  | 0  |
| <b>7.9</b>                      | 3.213±0.459                                    | 4.048±0.982                                    |
| <b>14.2</b>                     | 3.493±1.334                                    | 2.001±0.02                                     |
| <b>31.6</b>                     | 3.612±0.311                                    | 0.290±0.036                                    |

**Tabla 6.** Resultados de actividad enzimática encontrados a las 48 horas después de la inducción.

Este experimento confirmó que el medio sólido posee una capacidad más elevada que el medio líquido para atenuar el efecto tóxico que provoca el metanol en altas concentraciones. Sin embargo, las FML fueron más eficientes que en FMS para la producción de proteína heteróloga, tanto en cifras netas como en coeficientes de rendimiento de U g<sup>-1</sup>.

## **17. MATRIZ DE FERMENTACIONES DISEÑADAS PARA EVALUAR LAS POSIBLES DIFERENCIAS EN LA FISIOLÓGÍA Y LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN FMS Y FML.**

Para estudiar las posibles diferencias entre los soportes líquido y sólido en cuanto a fisiología del crecimiento y expresión heteróloga, se generó una matriz de combinaciones para las condiciones experimentales del cultivo. Se modificó la concentración de glicerol (9.03-32.64 y 90.4 g L<sup>-1</sup>) utilizada para generar biomasa. La concentración de metanol (0 - 7.9 y 31.6 g L<sup>-1</sup>) utilizada para inducir la expresión de lacasa heteróloga y el tiempo (48 -72 y 168 h) en el cual el cultivo creció con glicerol como única fuente de carbono.

Se realizaron tres tandas de fermentaciones, con tres concentraciones diferentes de glicerol, debido al comportamiento diferencial sobre la expresión heteróloga que previsiblemente tendrían biomasas diferentes en configuraciones morfológicas diferentes (pequeños y grandes agregados celulares sobre FMS). Teniendo en cuenta las

conclusiones extraídas a partir del experimento descrito en el apartado 15, el tiempo en el cual el cultivo debe crecer con glicerol como única fuente de carbono (TG) debe incrementarse proporcionalmente con la cantidad de glicerol incluida en el medio, a fin de poder medir la actividad heteróloga tras ser inducido el cultivo. Al mismo tiempo el valor de TG coincide con el tiempo en el cual el metanol es incorporado al cultivo. Para inducir la expresión heteróloga, al momento de incorporar el metanol el glicerol debe tener una concentración de cero o muy próxima a cero, de manera que no se reprima la expresión heteróloga. Finalmente, se probaron tres concentraciones de metanol diferentes, para evaluar el efecto sobre la expresión heteróloga en presencia de mayores cantidades de inductor.

| Tipo de cultivo | Glicerol inicial gL <sup>-1</sup> | TG (h) | Tartrato gL <sup>-1</sup> | Metanol gL <sup>-1</sup> |
|-----------------|-----------------------------------|--------|---------------------------|--------------------------|
| FML/FMS         | 9.03                              | 48     | 30.7                      | 0                        |
| FML/FMS         | 9.03                              | 48     | 3.07                      | 7.9                      |
| FML/FMS         | 9.03                              | 48     | 3.07                      | 31.6                     |
| FML/FMS         | 32.64                             | 72     | 12.22                     | 0                        |
| FML/FMS         | 32.64                             | 72     | 12.22                     | 7.9                      |
| FML/FMS         | 32.64                             | 72     | 12.22                     | 31.6                     |
| FML/FMS         | 90.4                              | 168    | 30.78                     | 0                        |
| FML/FMS         | 90.4                              | 168    | 30.78                     | 7.9                      |
| FML/FMS         | 90.4                              | 168    | 30.78                     | 31.6                     |

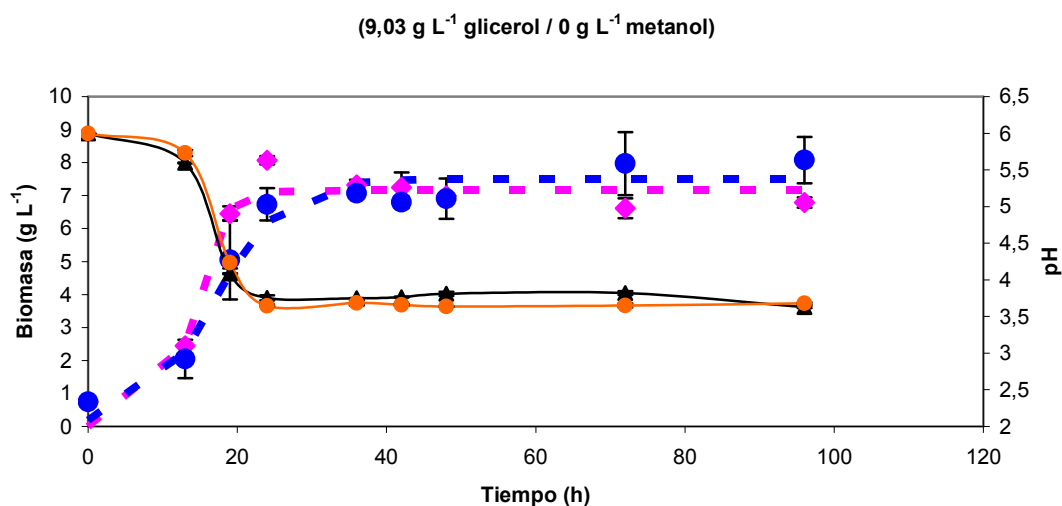
**Tabla 7:** Condiciones experimentales diseñadas para evaluar las diferencias en la fisiología del crecimiento y la expresión heteróloga entre FML y FMS.

## 17.1 Fermentaciones con concentraciones 9.03 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial.

### 17.1.1. 9.03 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, 0 g L<sup>-1</sup> de metanol.

A continuación, se muestran las gráficas correspondientes a los resultados obtenidos en FMS y FML con 9.03 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial y 0 g L<sup>-1</sup> de metanol (Fig.

41). Para este lote de fermentaciones, los cultivos se incubaron en presencia de glicerol durante 48 h, después de este periodo se incorporó el metanol.



**Figura 41.** Datos de biomasa obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.1.1, 9.03 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, 0 g L<sup>-1</sup> de metanol. En color negro ▲ (FML) y naranja ● (FMS) se muestra el comportamiento del pH. La línea rosa representa el modelo logístico al que se ajustan los datos para FML, mientras que para FMS el modelo se ajusta a la línea de tendencia azul.

A continuación, se muestran los resultados del glicerol consumido en la cinética de la Fig 41 (tabla 8).

| T (h) | Glicerol remanente (g L <sup>-1</sup> ) |            | Tartrato amónico remanente (g L <sup>-1</sup> ) |           |
|-------|---|------------|---|-----------|
|       | FML                                     | FMS        | FML   | FMS       |
| 0     | 10.06±0.02                              | 10.55±0.05 | 1.94±0.08                                       | 1.94±0.1  |
| 24    | 2.37±0.91                               | 3.05±0.86  | 0.51±0.12                                       | 0.75±0.20 |
| 72    | 0                                       | 0          | 0.25±0.01                                       | 0.38±0.05 |
| 96    | 0                                       | 0          | 0   | 0.25±0.01 |

**Tabla 8:** Datos del glicerol consumido en las condiciones experimentales del apartado 17.1.1.

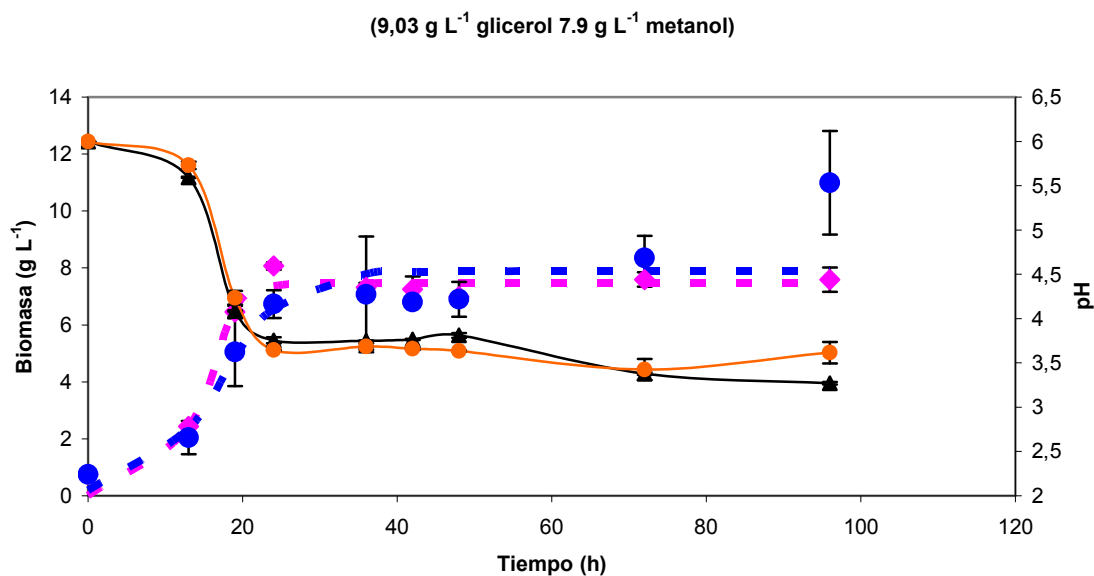
En esta cinética se corroboró la ausencia de actividad enzimática basal, además, la medición de actividad heteróloga en las dos fermentaciones con presencia de inductor justo antes de incorporar el metanol confirma la ausencia de actividad basal.

### 17.1.2. 9.03 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, 7.9 g L<sup>-1</sup> de metanol.

En las siguientes gráficas se muestran los datos de biomasa y actividad enzimática, en condiciones de inducción con baja concentración del inductor (7.9 g L<sup>-1</sup>



<sup>1</sup>). El metanol se incorporó en el medio después de 48 horas en crecimiento con glicerol (Fig. 42).



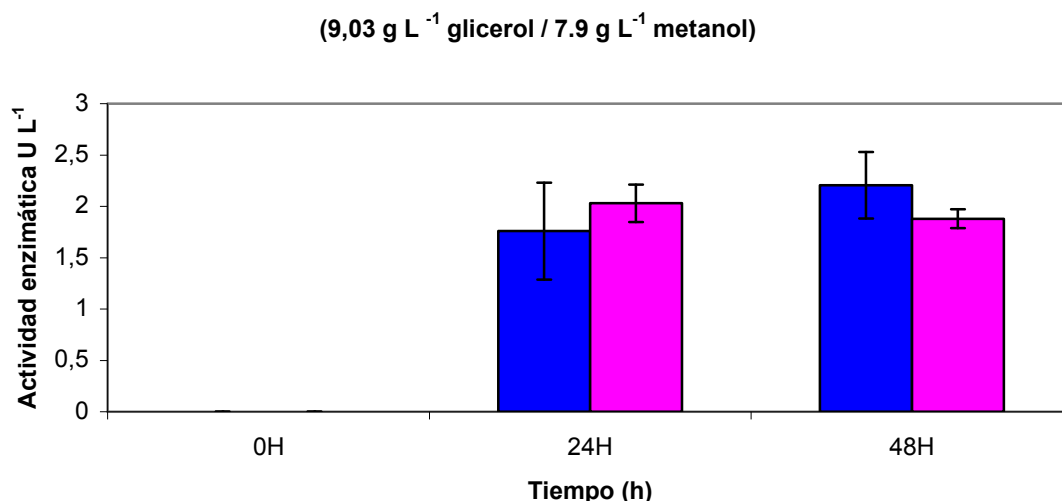
**Figura. 42.** Datos de biomasa obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.1.2. 9.03 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, 7.9 g L<sup>-1</sup> de metanol. En color negro ▲ (FML) y naranja ● (FMS) se muestra el comportamiento del pH. La línea rosa representa el modelo logístico al que se ajustan los datos para FML, mientras para FMS el modelo se ajusta a la línea de tendencia azul.

A continuación, se muestran los resultados del glicerol consumido en la cinética de la Fig 42 (tabla 9).

| T (h) | Glicerol remanente (g L <sup>-1</sup> ) |            | Tartrato amónico remanente (g L <sup>-1</sup> ) |           |
|-------|---|------------|---|-----------|
|       | FML                                     | FMS        | FML   | FMS       |
| 0     | 12.63±0.04                              | 13.23±0.41 | 1.77±0.32                                       | 1.94±0.02 |
| 24    | 3.08±1.05                               | 3.83±1.32  | 0.93±0.007                                      | 0.75±0.20 |
| 72    | 0.04±0.01                               | 0.09±0.01  | 0.80±0.20                                       | 0.38±0.05 |
| 96    | 0.04±0.008                              | 0.03±0.01  | 0.73±0.21                                       | 0.25±0.01 |

**Tabla 9.** Datos del glicerol consumido en las condiciones experimentales del apartado 17.1.2.

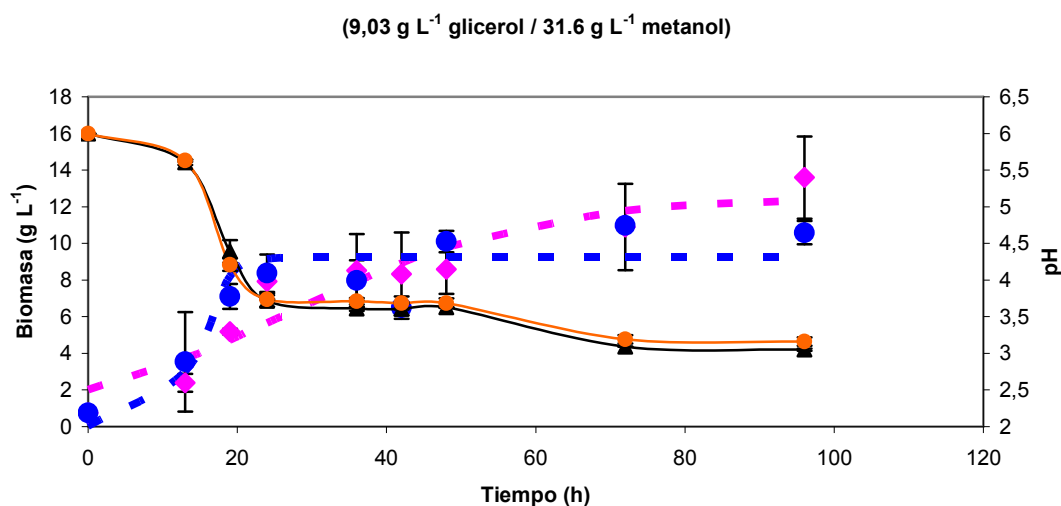
En la siguiente gráfica están representados los valores de actividad enzimática encontrados. (Fig. 43)



**Figura 43.** En la figura se muestra la actividad enzimática medida en U L<sup>-1</sup> a lo largo de las 48 h de inducción (tres puntos de monitoreo 0, 24 y 48h). En las condiciones descritas en el apartado 17.1.2. En azul se muestran los datos para FMS en rosa están representados los datos obtenidos para FML.

### 17.1.3. 9.03 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, 31.6 g L<sup>-1</sup> de metanol

Los siguientes resultados muestran los datos recuperados para biomasa y actividad enzimática, en las mismas condiciones descritas en el apartado 17.1.2., con la variación que aquí se adicionaron 31.6 g L<sup>-1</sup> de metanol transcurridas 48h. (Fig 44).



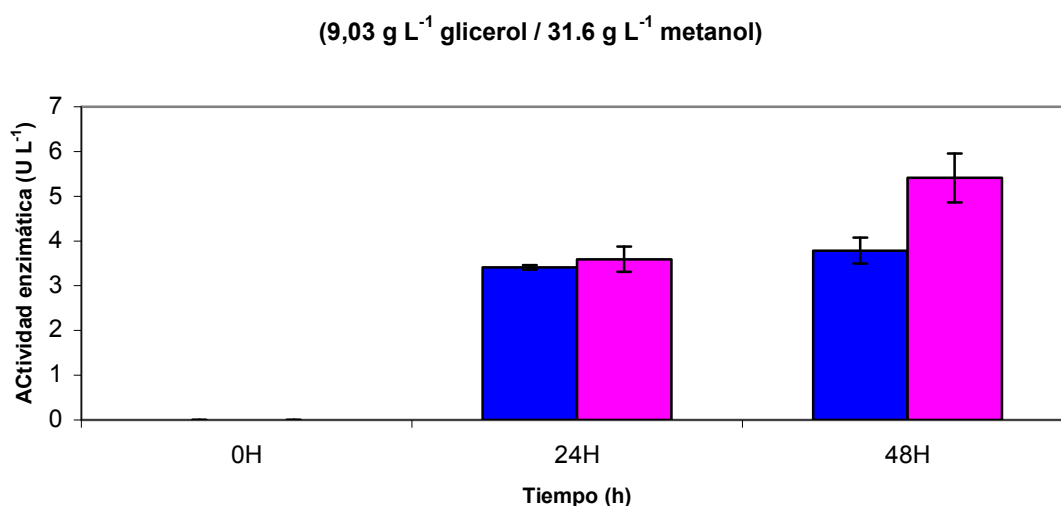
**Figura 44.** Datos de biomasa obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.1.3. 9.03 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, 31.6 g L<sup>-1</sup> de metanol. En color negro ▲ (FML) y naranja ● (FMS) se muestra el comportamiento del pH. La línea rosa representa el modelo logístico al que se ajustan los datos para FML, mientras para FMS el modelo se ajusta a la línea de tendencia azul.

A continuación, se muestran los resultados del glicerol consumido en la cinética de la Fig. 44 (tabla 10).

| T (h) | Glicerol remanente (g L <sup>-1</sup> ) |            | Tartrato amónico remanente (g L <sup>-1</sup> ) |           |
|-------|---|------------|---|-----------|
|       | FML                                     | FMS        | FML   | FMS       |
| 0     | 12.63±0.32                              | 13.23±0.47 | 1.87±0.01                                       | 1.94±0.02 |
| 24    | 3.08±1.05                               | 3.83±1.32  | 0.93±0.007                                      | 0.75±0.20 |
| 72    | 0.04±0.01                               | 0.09±0.01  | 0.80±0.20                                       | 0.38±0.05 |
| 96    | 0.04±0.008                              | 0.03±0.01  | 0.73±0.21                                       | 0.25±0.01 |

**Tabla 10:** Datos de glicerol consumido en las condiciones experimentales del apartado 17.1.3.

En la siguiente gráfica están representados los valores de actividad enzimática encontrados (Fig. 45).

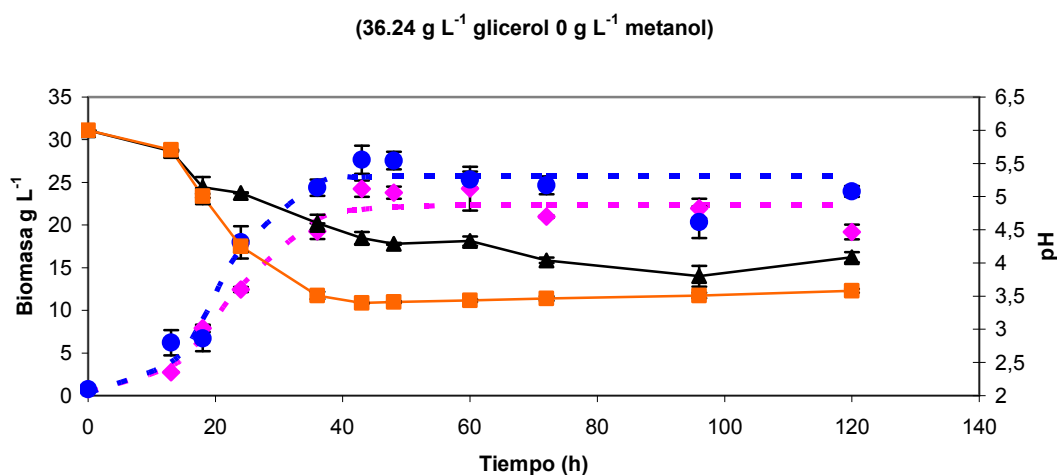


**Figura 45.** En la figura se muestra la actividad enzimática medida en U L<sup>-1</sup> a lo largo de las 48 h de inducción (tres puntos de monitoreo 0, 24 y 48 h). En las condiciones descritas en el apartado 17.1.3. En azul se muestran los datos para FMS y en rosa están representados los datos obtenidos para FML

## 17.2 Fermentaciones con 36.24 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial.

### 17.2.1. Fermentaciones con 36.24 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial y 0 g L<sup>-1</sup> de metanol

En las siguientes gráficas se muestran los resultados obtenidos para biomasa y actividad enzimática en las fermentaciones con 36.24 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial y en ausencia de inductor. (Fig. 46). Para este lote de fermentaciones, los cultivos permanecieron creciendo en presencia de glicerol durante 72 h, después de este periodo se incorporó el metanol.



**Figura 46.** Datos de biomasa obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.2.1. 36.24 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, 0 g L<sup>-1</sup> de metanol. En color negro ▲ (FML) y naranja ● (FMS) se muestra el comportamiento del pH. La línea rosa representa el modelo logístico al que se ajustan los datos para FML, mientras que para FMS el modelo se ajusta a la línea de tendencia azul.

A continuación se muestran los resultados del glicerol consumido en la cinética de la Fig 46 (tabla 11).

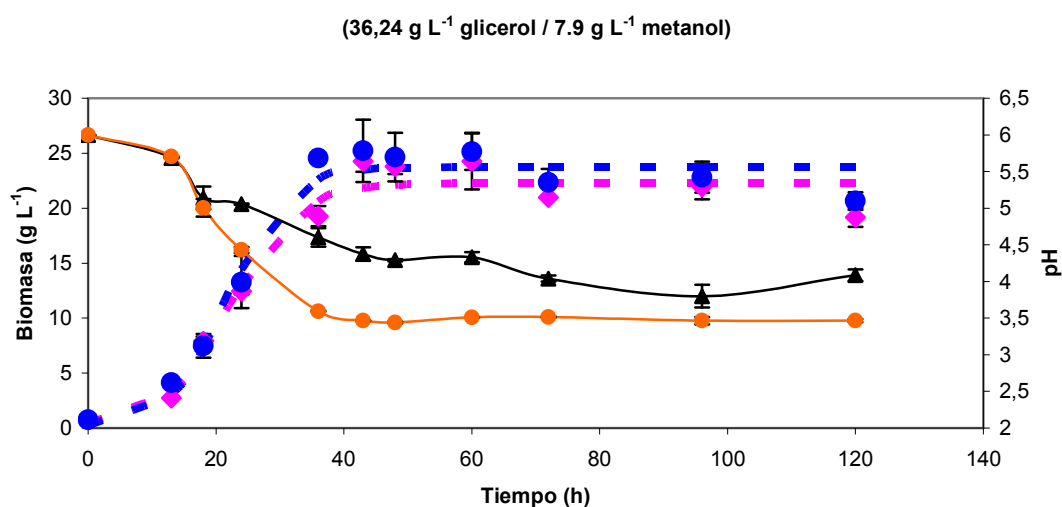
| T (h) | Glicerol remanente (g L <sup>-1</sup> ) |            | Tartrato amónico (g L <sup>-1</sup> ) |            |
|-------|---|------------|---------------------------------------|------------|
|       | FMS                                     | FML        | FML                                   | FMS        |
| 0     | 37.18±0.84                              | 34.18±1.05 | 16.26±0.52                            | 16.56±1.94 |
| 24    | 16.92±2.70                              | 19.66±3.14 | 11.62±3.02                            | 8.40±1.07  |
| 48    | 0.23±0.14                               | 0.32±0.20  | 7.24±0.03                             | 4.64±0.96  |
| 72    | 0.06±0.01                               | 0.26±0.16  | 6.94±0.06                             | 4.20±1.16  |
| 96    | 0.15±0.003                              | 0.15±0.08  | 6.83±1.28                             | 2.84±0.18  |
| 120   | 0                                       | 0.07±0.013 | 5.65±0.01                             | 2.71±0.43  |

**Tabla 11.** Datos del glicerol consumido en las condiciones experimentales del apartado 17.2.1.

En esta cinética se corroboró la ausencia de actividad enzimática basal, además, la medición de actividad heteróloga en las dos fermentaciones con presencia de inductor justo antes de incorporar el metanol confirma la ausencia de actividad basal.

### 17.2.2. Fermentaciones con 36.24 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial y 7.9 g L<sup>-1</sup> de metanol

En los siguientes experimentos se mantuvieron las condiciones de cultivo descritas en el apartado 17.2.1. ( $36.24 \text{ g L}^{-1}$ ) con la variante de que a las 72 horas se añadió  $7.9 \text{ g L}^{-1}$  de metanol para inducir la expresión heteróloga de lacasa (Fig. 47).



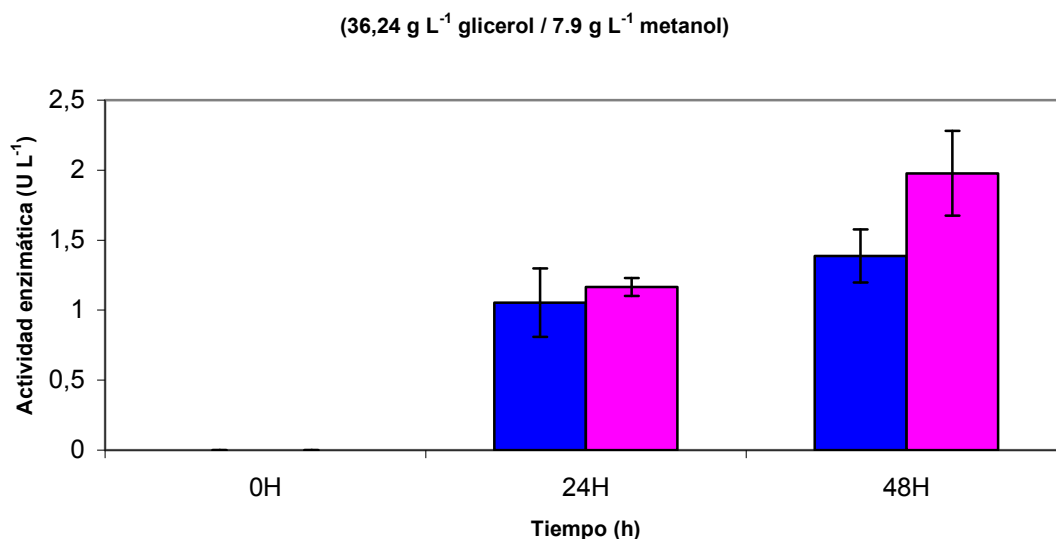
**Figura 47.** Datos de biomasa obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.2.2.  $36.24 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol inicial,  $7.9 \text{ g L}^{-1}$  de metanol. En color negro ▲ (FML) y naranja ● (FMS) se muestra el comportamiento del pH. La línea rosa representa el modelo logístico al que se ajustan los datos para FML, mientras para FMS el modelo se ajusta a la línea de tendencia azul.

A continuación, se muestran los resultados del glicerol consumido en la cinética de la Fig 47 (tabla 12).

| T (h) | Glicerol remanente ( $\text{g L}^{-1}$ ) |                  | Tartrato amónico ( $\text{g L}^{-1}$ ) |                  |
|-------|--|------------------|--|------------------|
|       | FML                                      | FMS              | FML                                    | FMS              |
| 0     | $39.52 \pm 0.86$                         | $34.18 \pm 0.97$ | $16.26 \pm 1.04$                       | $16.24 \pm 2.39$ |
| 24    | $20.97 \pm 5.13$                         | $19.66 \pm 3.14$ | $11.62 \pm 3.02$                       | $8.41 \pm 1.07$  |
| 48    | $0.97 \pm 1.15$                          | $0.32 \pm 0.20$  | $7.24 \pm 0.03$                        | $4.64 \pm 0.96$  |
| 72    | $0.71 \pm 0.54$                          | $0.26 \pm 0.16$  | $6.94 \pm 0.06$                        | $4.20 \pm 1.26$  |
| 96    | $0.17 \pm 0.003$                         | $0.15 \pm 0.08$  | $6.83 \pm 1.28$                        | $3.95 \pm 0.44$  |
| 120   | $0.033 \pm 0.025$                        | $0.07 \pm 0.013$ | $5.65 \pm 0.01$                        | $2.98 \pm 0.04$  |

**Tabla 12.** Datos del glicerol consumido en las condiciones experimentales del apartado 17.2.2.

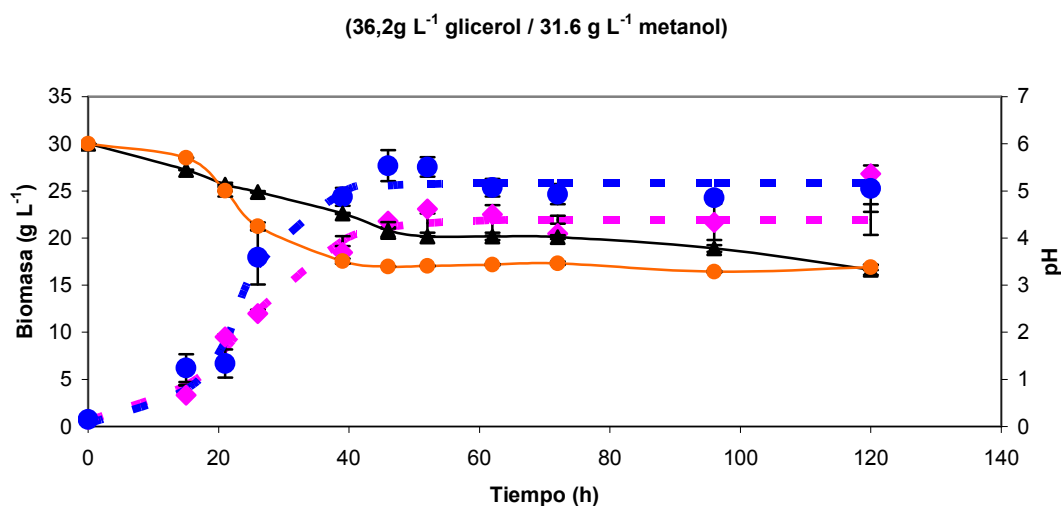
En la siguiente gráfica están representados los valores de actividad enzimática encontrados (Fig. 48).



**Figura. 48** En la figura se muestra la actividad enzimática medida en U L<sup>-1</sup> a lo largo de las 48 h de inducción ( tres puntos de monitoreo 0, 24 y 48 h). En las condiciones descritas en el apartado 17.2.2. En azul se muestran los datos para FMS y en rosa están representados los datos obtenidos para FML

### 17.2.3. Fermentaciones con 36.24 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial y 31.6 g L<sup>-1</sup> de metanol

En los siguientes experimentos se mantuvieron las condiciones de cultivo descritas en el apartado 17.2.1, (36.24 g L<sup>-1</sup>) con la variante de que a las 72 horas se adicionaron 31.6 g L<sup>-1</sup> de metanol para inducir la expresión heteróloga de la lacasa. (Fig. 49)



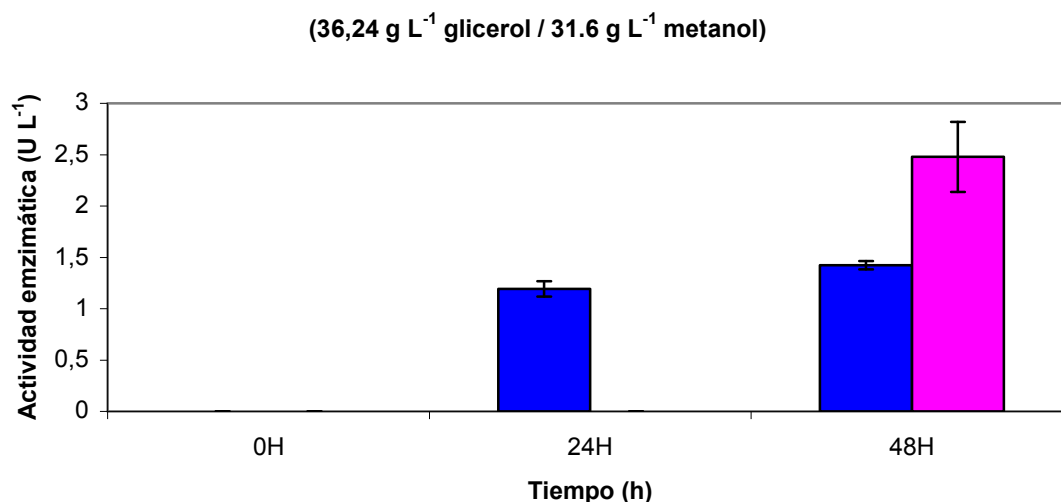
**Figura 49.** Datos de biomasa obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.2.3. 36.24 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, 31.6g L<sup>-1</sup> de metanol. En color negro ▲ (FML) y naranja ● (FMS) se muestra el comportamiento del pH. La línea rosa representa el modelo logístico al que se ajustan los datos para FML, mientras para FMS el modelo se ajusta a la línea de tendencia azul.

A continuación, se muestran los resultados del glicerol consumido en la cinética de la Fig 49 (tabla 13).

| T (h) | Glicerol remanente (g L <sup>-1</sup> ) |           | Tartrato amónico remanente (g L <sup>-1</sup> ) |           |
|-------|---|-----------|---|-----------|
|       | FML                                     | FMS       | FML   | FMS       |
| 0     | 37.0±0.41                               | 36.5±2.01 | 14.1±0.97                                       | 15.6±0.31 |
| 24    | 25.8±6.83                               | 11.9±2.65 | 11.4±2.71                                       | 7.39±1.09 |
| 48    | 0.51±0.27                               | 0.20±0.06 | 9.65±1.57                                       | 6.41±1.38 |
| 72    | 0.08±0.09                               | 0.04±0.01 | 8.35±2.18                                       | 5.01±0.19 |
| 96    | 0.13±0.13                               | 0.17±0.01 | 3.25±0.55                                       | 4.53±0.71 |
| 120   | 0.06±0.04                               | 0.02±0.01 | 3.21±0.12                                       | 3.24±0.24 |

**Tabla 13.** Datos del glicerol consumido en las condiciones experimentales del apartado 17.2.3.

En la siguiente gráfica están representados los valores de actividad enzimática encontrados (Fig. 50).



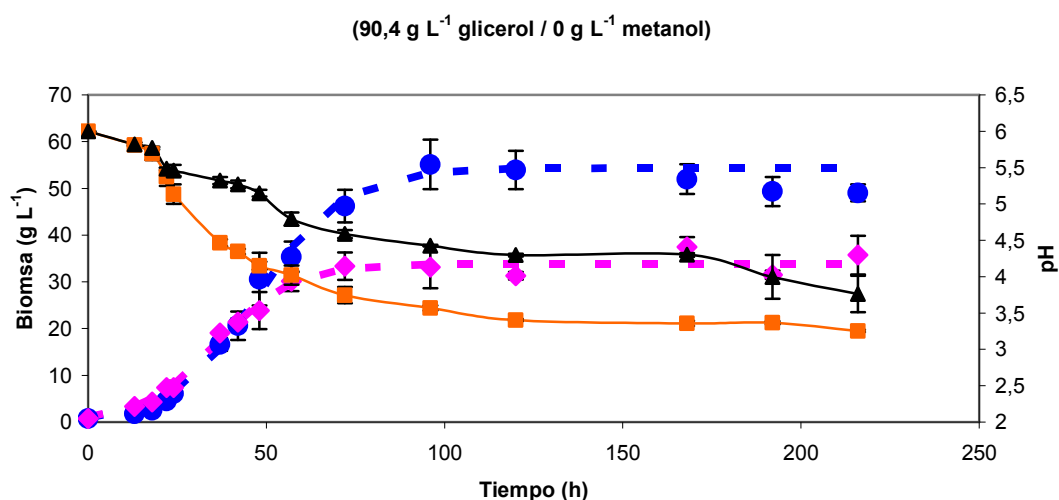
**Figura 50.** En la figura se muestra la actividad enzimática medida en U L<sup>-1</sup> a lo largo de las 48 h de inducción ( tres puntos de monitoreo 0, 24 y 48 h). En las condiciones descritas en el apartado 17.2.3. En azul se muestran los datos para FMS y en rosa están representados los datos obtenidos para FML.

### 17.3 Fermentaciones con 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial.

#### 17.3.1. Fermentaciones con 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial y 0 g L<sup>-1</sup> de metanol.

En las siguientes gráficas, se muestran los resultados obtenidos para biomasa y actividad enzimática, en las fermentaciones con 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial y en

ausencia de inductor. Para esta tanda de fermentaciones, los cultivos permanecieron creciendo en glicerol durante 168 h, después de este periodo se incorporó el metanol.



**Figura 51.** Datos de biomasa obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.3.1. 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, 0 g L<sup>-1</sup> de metanol. En color negro ▲ (FML) y naranja ● (FMS) se muestra el comportamiento del pH. La línea rosa representa el modelo logístico al que se ajustan los datos para FML, mientras que para FMS el modelo se ajusta a la línea de tendencia azul.

A continuación, se muestran los resultados del glicerol consumido en la cinética de Fig 51 (tabla 14).

| T. (h) | Glicerol remanente. (g L <sup>-1</sup> ) |           | Tartrato amónico remanente (g L <sup>-1</sup> ) |            |
|--------|--|-----------|---|------------|
|        | FML                                      | FMS       | FML   | FMS        |
| 0      | 88.2±1.05                                | 94.5±2.04 | 34.1±0.24                                       | 37.01±0.94 |
| 24     | 63.4±6.20                                | 24.8±0.46 | 26.1±0.13                                       | 10.1±0.04  |
| 48     | 59.2±1.39                                | 15.6±7.15 | 23.2±7.65                                       | 8.05±1.14  |
| 72     | 42.1±7.44                                | 8.44±2.52 | 21.9±2.68                                       | 6.58±0.01  |
| 96     | 22.4±12.7                                | 1.56±0.44 | 12.4±5.19                                       | 6.23±2.83  |
| 120    | 13.56±2.04                               | 0.56±0.23 | 10.35±0.93                                      | 5.14±0.56  |
| 168    | 5.36±1.02                                | 0.12±0.05 | 10.11±1.02                                      | 5.12±0.61  |
| 192    | 1.21±0.36                                | 0.03±0.01 | 9.36±0.85                                       | 4.87±0.94  |
| 216    | 0.12±0.1                                 | 0.00±0    | 9.12±1.06                                       | 4.98±0.16  |

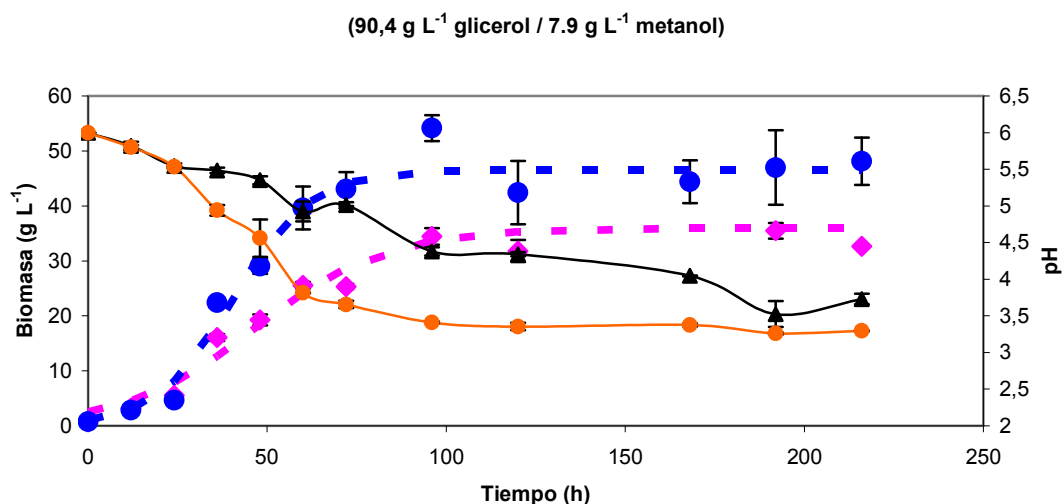
**Tabla 14.** Datos del glicerol consumido en las condiciones experimentales del apartado 17.3.1.

En esta cinética se corroboró la ausencia de actividad enzimática basal, además, la medición de actividad heteróloga en las dos fermentaciones con presencia de inductor justo antes de incorporar el metanol confirma la ausencia de actividad basal.



### 17.3.2. Fermentaciones con 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial y 7.9 g L<sup>-1</sup> de metanol.

En los siguientes experimentos se mantuvieron las condiciones de cultivo descritas en el apartado 17.3.1, con la variante de que a las 168 horas se añadieron 7.9 g L<sup>-1</sup> de metanol para inducir la expresión heteróloga de la lacasa (Fig. 52).



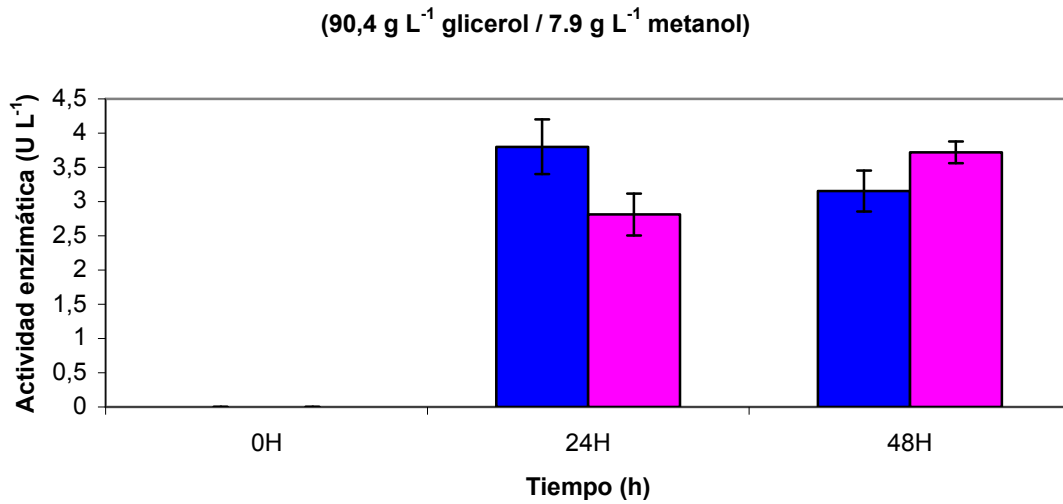
**Figura 52.** Datos de biomasa obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.3.2. 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, 7.9 g L<sup>-1</sup> de metanol. En color negro ▲ (FML) y naranja ● (FMS) se muestra el comportamiento del pH. La línea rosa representa el modelo logístico al que se ajustan los datos para FML, mientras para FMS el modelo se ajusta a la línea de tendencia azul.

A continuación, se muestran los resultados de glicerol consumido en la cinética de la fig 52 (tabla 15).

| T. (h) | Glicerol remanente (g L <sup>-1</sup> ) |            | Tartrato amónico remanente (g L <sup>-1</sup> ) |            |
|--------|---|------------|---|------------|
|        | FML                                     | FMS        | FML   | FMS        |
| 0      | 88.2±1.05                               | 94.5±2.04  | 34.1±0.24                                       | 37.01±0.94 |
| 24     | 61.4±5.20                               | 19.8±2.46  | 24.1±0.04                                       | 9.1±0.34   |
| 48     | 56.2±2.39                               | 15.6±4.15  | 21.1±5.64                                       | 7.75±1.17  |
| 72     | 39.1±4.44                               | 7.44±3.12  | 19.9±1.88                                       | 6.14±0.12  |
| 96     | 22.9±8.7                                | 2.01±1.02  | 10.4±3.19                                       | 5.23±1.81  |
| 120    | 12.3±1.24                               | 1.14±0.85  | 11.5±1.12                                       | 4.15±1.02  |
| 168    | 3.24±0.96                               | 0.96±0.36  | 10.25±1.04                                      | 3.96±0.47  |
| 192    | 1.36±1.01                               | 0.02±0.001 | 8.96±1.23                                       | 3.41±0.89  |
| 216    | 0.84±0.14                               | 0.00±0.00  | 9.12±1.57                                       | 3.14±0.24  |

**Tabla 15.** Datos del glicerol consumido en las condiciones experimentales del apartado 17.3.2.

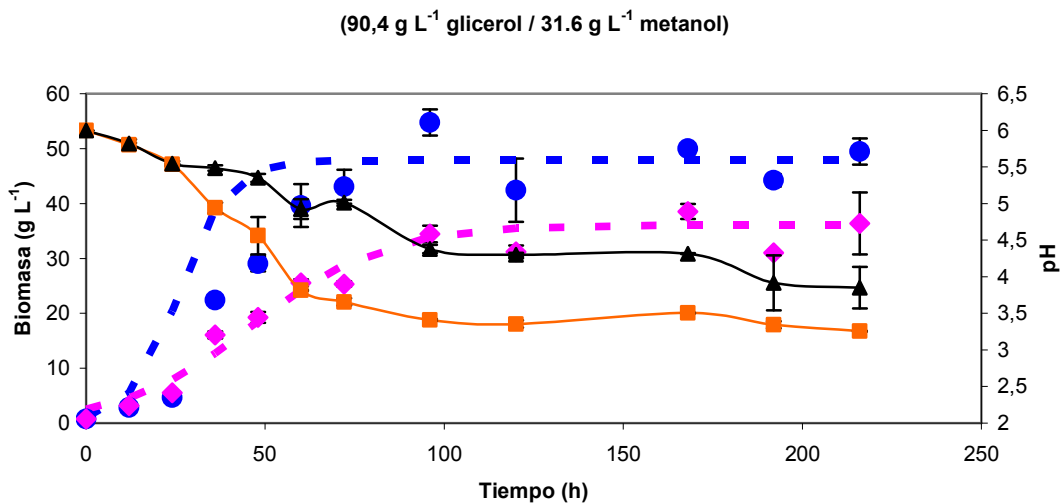
En la siguiente gráfica están representados los valores de actividad enzimática encontrados (Fig. 53).



**Figura 53.** En la figura se muestra la actividad enzimática medida en U L<sup>-1</sup> a lo largo de las 48 h de inducción (tres puntos de monitoreo 0, 24 y 48 h). En las condiciones descritas en el apartado 17.3.2. En azul se muestran los datos para FMS y en rosa están representados los datos obtenidos para FML.

### 17.3.3. Fermentaciones con 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial y 31.6 g L<sup>-1</sup> de metanol.

En los siguientes experimentos se mantuvieron las condiciones de cultivo descritas en el apartado 17.3.1, con la variante de que a las 168 horas se añadieron 31.6 g L<sup>-1</sup> de metanol para inducir la expresión heteróloga de la lacasa. (Fig. 54)



**Figura 54.** Datos de biomasa obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 17.3.3. 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, 31.6 g L<sup>-1</sup> de metanol. En color negro ▲ (FML) y naranja ● (FMS) se muestra el

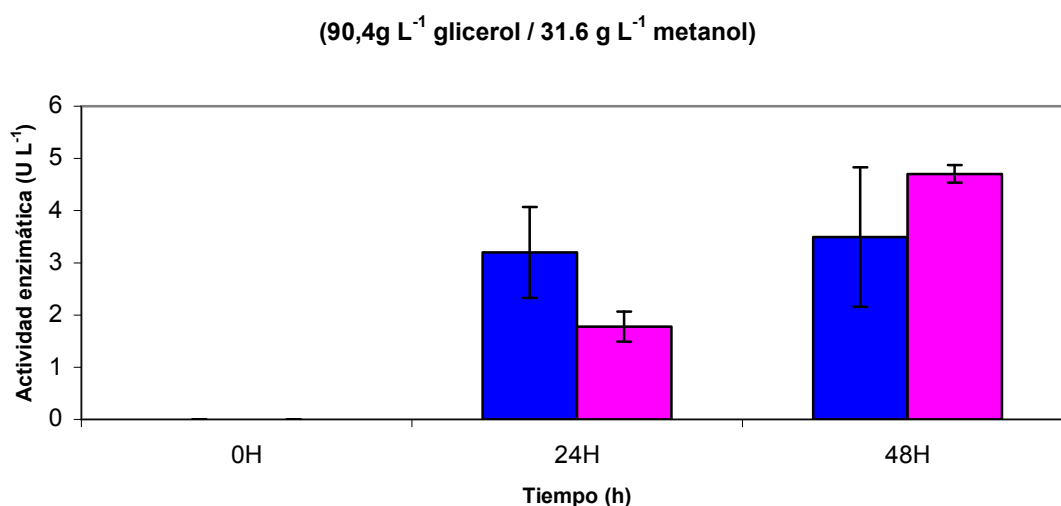
comportamiento del pH. La línea rosa representa el modelo logístico al que se ajustan los datos para FML, mientras para FMS el modelo se ajusta a la línea de tendencia azul.

A continuación, se muestran los resultados del glicerol consumido en la cinética de la Fig 54 (tabla 16).

| T. (h) | Glicerol remanente (g L <sup>-1</sup> ) |           | Tartrato amónico remanente (g L <sup>-1</sup> ) |           |
|--------|---|-----------|---|-----------|
|        | FML                                     | FMS       | FML   | FMS       |
| 0      | 88.2±0                                  | 94.5±0    | 34.1±0  | 37.01±0   |
| 24     | 61.4±4.90                               | 21.8±0.12 | 28.1±0.14                                       | 13.1±0.04 |
| 48     | 57.2±2.29                               | 12.6±3.15 | 21.2±5.65                                       | 7.88±1.02 |
| 72     | 42.1±8.44                               | 6.44±2.02 | 18.9±2.68                                       | 6.14±0.12 |
| 96     | 20.4±6.7                                | 1.13±0.44 | 10.4±5.19                                       | 5.23±2.83 |
| 120    | 17.2±1.24                               | 1.25±0.05 | 10.2±1.10                                       | 4.87±1.02 |
| 168    | 8.31±0.78                               | 0.98±0.14 | 9.3±0.21  | 3.12±0.02 |
| 192    | 2.14±0.56                               | 0.00±0.00 | 7.48±2.02                                       | 4.56±0.51 |
| 216    | 0.97±0.04                               | 0.00±0.00 | 8.14±3.56                                       | 3.65±0.38 |

**Tabla 16.** Datos del glicerol consumido en las condiciones experimentales del apartado 17.3.3.

En la siguiente gráfica están representados los valores de actividad enzimática encontrados (Fig. 55).

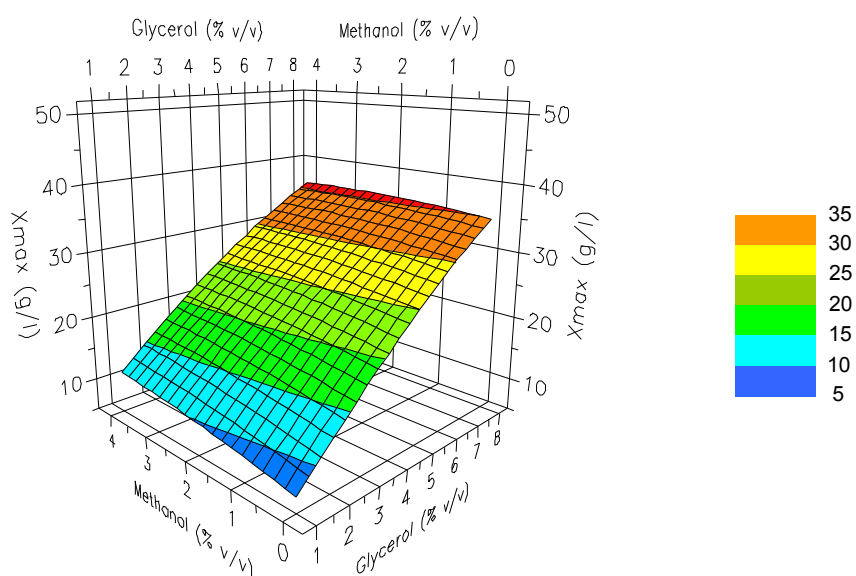


**Figura 55.** En la figura se muestra la actividad enzimática medida en U L<sup>-1</sup> a lo largo de las 48 h de inducción (tres puntos de monitoreo 0, 24 y 48 h). Para las condiciones descritas en el apartado 17.3.3. En azul se muestran los datos para FMS y en rosa están representados los datos obtenidos para FML.

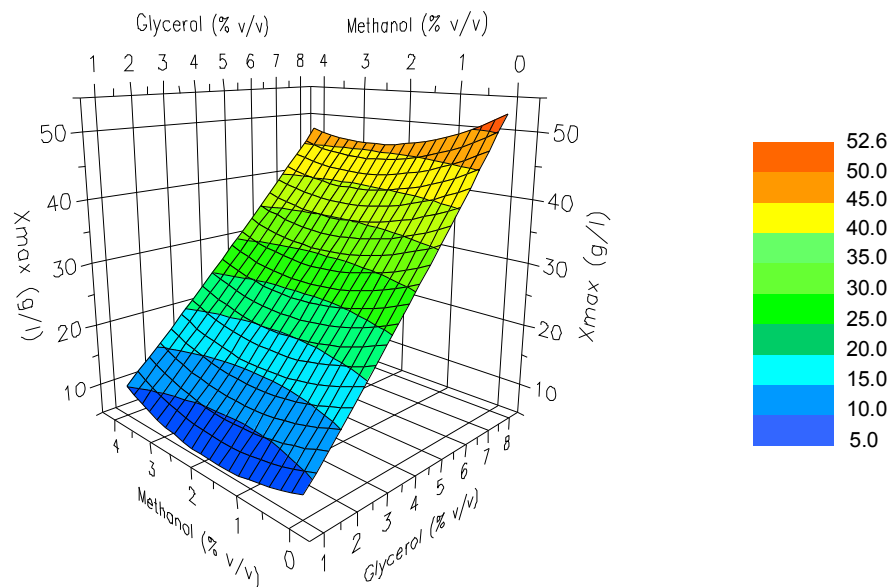
## 18. SUPERFICIES DE RESPUESTA GENERADAS A PARTIR DE LA MATRIZ DE FERMENTACIONES

Para sintetizar los resultados que se desprenden de la tabla 7, y utilizando el paquete informático Fussion-Pro se generaron 4 superficies de respuesta, dos para FMS y dos para FML. En los ejes X e Y tenemos las concentraciones en v/v de glicerol y metanol respectivamente, encontrando la variable de respuesta en el eje Z, que en su caso puede ser el valor de biomasa máxima obtenida, (medido en  $g L^{-1}$ ), o bien la actividad enzimática encontrada tras 48h de inducción (medida en  $U L^{-1}$ ).

En la Fig. 56 se puede observar el efecto de la concentración inicial de glicerol, y la concentración de metanol en el valor de biomasa máxima obtenido en fermentaciones líquidas. Mientras que en la Fig. 57 se puede ver el efecto de las mismas variables sobre la biomasa máxima obtenida sobre fermentaciones sólidas.



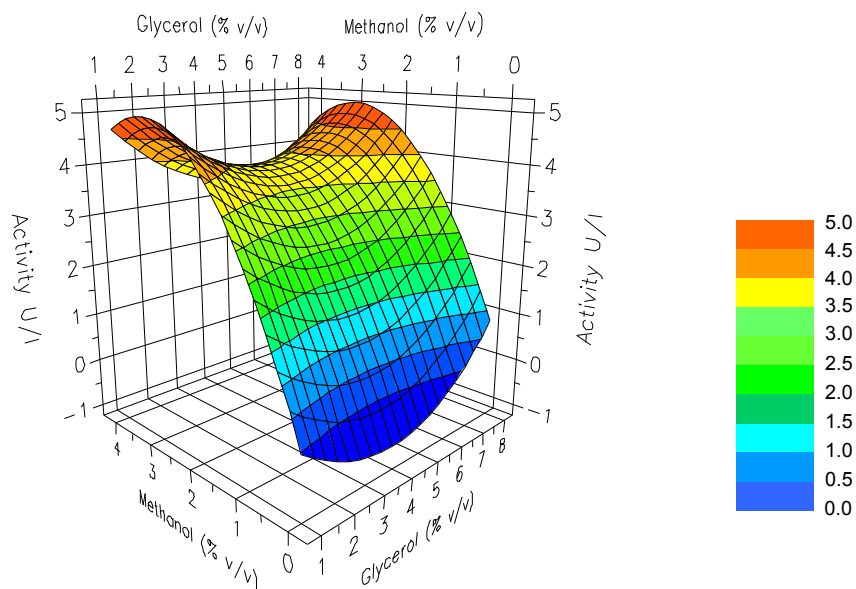
**Figura 56.** Superficie de respuesta generada a partir de datos en FML. En el eje X está graficada la concentración de glicerol en % v/v. En el eje Y está graficada la concentración de metanol en % v/v. Como variable de respuesta y graficado en el eje Z está el valor de biomasa máxima obtenida, medido en  $g L^{-1}$ .



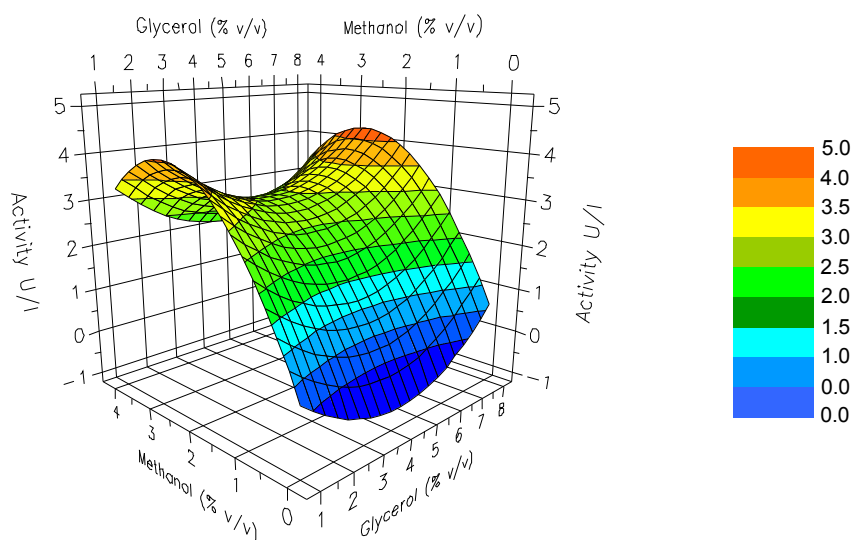
**Figura 57.** Superficie de respuesta generada a partir de datos en FMS. En el eje X está graficada la concentración de glicerol en % v/v. En el eje Y está graficada la concentración de metanol en % v/v. Como variable de respuesta y graficado en el eje Z está el valor de biomasa máxima obtenido, medido en  $g L^{-1}$ .

Estos resultados resumen los datos obtenidos en la matriz de fermentaciones del apartado 17 de resultados en cuanto a producción de biomasa. Donde podemos observar que las fermentaciones en medio sólido producen más biomasa que las fermentaciones en medio líquido. Este efecto se percibe de forma acusada cuando no hay metanol presente en el medio.

Siguiendo el mismo análisis y con la finalidad de visualizar de forma sintética los datos obtenidos de las condiciones experimentales resumidas en la tabla 7, se muestran a continuación la Fig. 58, donde podemos visualizar el efecto de la concentración de inicial glicerol, y la concentración de metanol sobre el valor de actividad enzimática máxima obtenida sobre cultivo líquido. De la misma manera, en la Fig. 59 podemos observar el efecto de las mismas variables antes citadas, sobre el valor de actividad enzimática encontrada sobre fermentaciones en medio sólido



**Figura 58.** Superficie de respuesta generada a partir de datos en FML. En el eje X está graficada la concentración de glicerol en % v/v. En el eje Y está graficada la concentración de metanol en % v/v. Como variable de respuesta y graficado en el eje Z está el valor de actividad enzimática máxima obtenido, medido en  $U L^{-1}$ .



**Figura 59.** Superficie de respuesta generada a partir de datos en FMS. En el eje X está graficada la concentración de glicerol en % v/v. En el eje Y está graficada la concentración de metanol en % v/v. Como variable de respuesta y graficado en el eje Z está el valor de actividad enzimática máxima obtenido, medido en  $U L^{-1}$ .

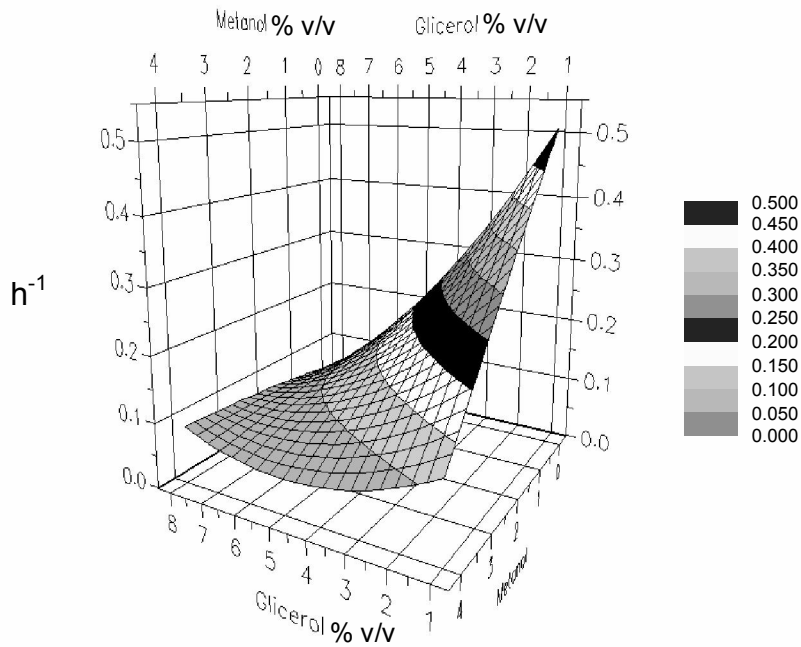
Estos resultados no muestran una relación de aparente proporcionalidad como se ve en el caso del efecto sobre la biomasa, en este caso la actividad enzimática desciende cuando se utiliza  $36 g L^{-1}$  de glicerol. Esto podría ser debido a que se encuentra en el

límite en que el glicerol se está terminando pero todavía puede ejercer un efecto represor sobre el gen *AOXI*.

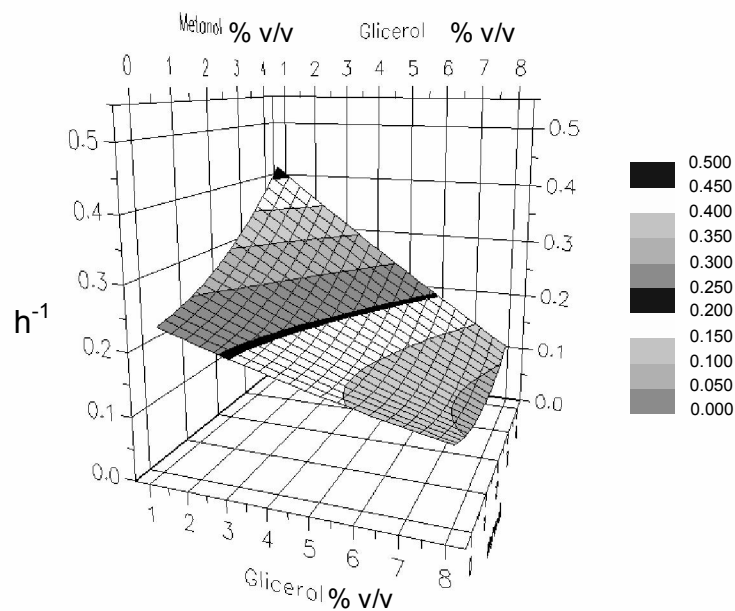
### **18.1 Efecto de la concentración de glicerol y la concentración de metanol sobre $\mu$ en FML y FMS**

Con la finalidad de visualizar de forma sintética, el comportamiento de  $\mu$  en las diferentes condiciones resumidas en la tabla 7, y utilizando el mismo paquete informático, se generaron 2 superficies en las cuales la variable de respuesta generada fue  $\mu$ . En los ejes X e Y tenemos las concentraciones en v/v de glicerol y metanol, respectivamente, encontrando la variable de respuesta  $\mu$  en el eje Z.

En la Fig. 60 se puede observar como en las fermentaciones en medio líquido, la variable  $\mu$  se hizo más pequeña progresivamente a medida que se incrementó la cantidad de glicerol y metanol. Sin embargo, la variable  $\mu$  en las fermentaciones en medio sólido se comportó de una manera diferente, encontrándose que  $\mu$  descendió cuando se incrementó la cantidad de glicerol que se incorporó de manera inicial en el medio, sin embargo, se observó un incremento en la magnitud de esta variable cuando se incorporó más metanol en medio.



**Figura 60.** Superficie de respuesta generada a partir de datos en FML. En el eje X está graficada la concentración de glicerol, en % v/v. En el eje Y está graficada la concentración de metanol, en % v/v. Como variable de respuesta y graficado en el eje Z, está el valor de  $\mu$ , medida en  $h^{-1}$



**Figura 61.** Superficie de respuesta generada a partir de datos en FMS. En el eje X está graficada la concentración de glicerol en % v/v. En el eje Y está graficada la concentración de metanol en % v/v. Como variable de respuesta y graficado en el eje Z, está el valor de  $\mu$ , medida en  $h^{-1}$

**19. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL RENDIMIENTO ( $U\ g^{-1}$ ) DE BIOMASA GENERADO SOBRE FML y FMS EN AUSENCIA TOTAL DE GLICEROL.**



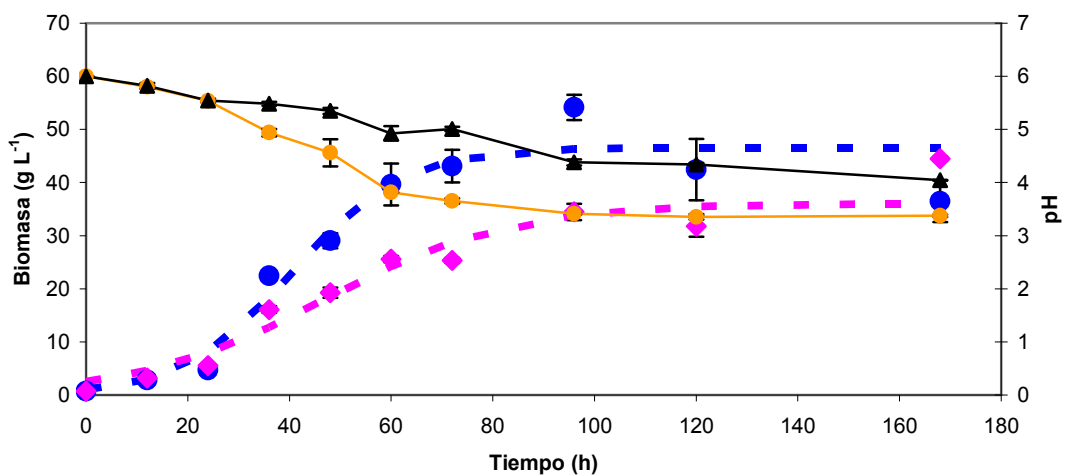
Teniendo en cuenta que el rendimiento de unidades generados por gramo de biomasa producidos en las fermentaciones en medio sólido durante la tanda de fermentaciones del apartado 17, fueron menores de lo esperado, (de acuerdo con la hipótesis propuesta, la mayor disponibilidad de oxígeno condicionaría que las fermentaciones mejor aireados deberían tener una mayor producción de enzima heteróloga, lo cual no sucedió) y una vez evaluadas las causas que podrían originar ese resultado, se decidió realizar un experimento que involucró tres cinéticas, utilizando 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, prolongando los cultivos durante 120 h en medio BMG. Dos de estas fermentaciones se realizaron en medio sólido, y una en medio líquido. Posteriormente la biomasa generada en cada tratamiento, se recuperó mediante centrifugación, eliminando de esta manera el glicerol que pudiera afectar a la expresión heteróloga. Después de este cultivo en glicerol, las fermentaciones se indujeron por un periodo de 48h, de tal manera que las cinéticas tuvieron una duración total de 168h. Una de las biomasas recuperadas de una cinética en medio sólido fue inducida en un nuevo soporte sólido estéril y con nuevo medio BMM. Las biomasas recuperadas de las otras dos cinéticas fueron inducidas sobre nuevo BMM líquido, encontrándose que el rendimiento en (U g<sup>-1</sup>) se incrementó un 53% en medio líquido respecto de la misma biomasa inducida sobre medio sólido. Este experimento también confirmó que los rendimientos (U g<sup>-1</sup>) generados por la biomasa producida en FMS y FML, y estas mismas biomasas, inducidas en medio líquido, fueron similares. La siguiente tabla muestra los coeficientes encontrados.

| Tratamiento | [Glicerol]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | [Metanol]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Rendimiento<br>(U g <sup>-1</sup> ) |
|-------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
|-------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|

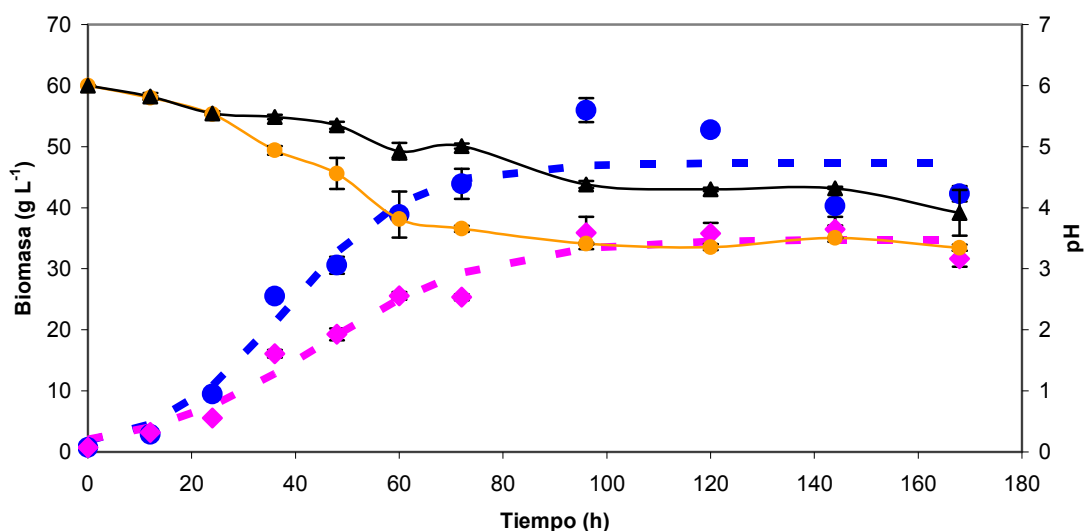
|                  |      |      |                   |
|------------------|------|------|-------------------|
| FML              | 90.4 | 7.9  | $0.124 \pm 0.038$ |
| FML              | 90.4 | 31.6 | $0.154 \pm 0.004$ |
| FMS              | 90.4 | 7.9  | $0.068 \pm 0.006$ |
| FMS              | 90.4 | 31.6 | $0.073 \pm 0.027$ |
| FMS <sup>a</sup> | 90.4 | 7.9  | $0.123 \pm 0.011$ |
| FMS <sup>a</sup> | 90.4 | 31.6 | $0.185 \pm 0.054$ |

**Tabla 17.** Valores de los coeficientes de rendimiento encontrados ( $U L^{-1}$  por gramo de biomasa) <sup>a</sup> Biomasa generada en soporte sólida y sometida a inducción en medio líquido.

A continuación se muestran las curvas de biomasa producida bajo las condiciones del apartado 19.(Fig. 62).



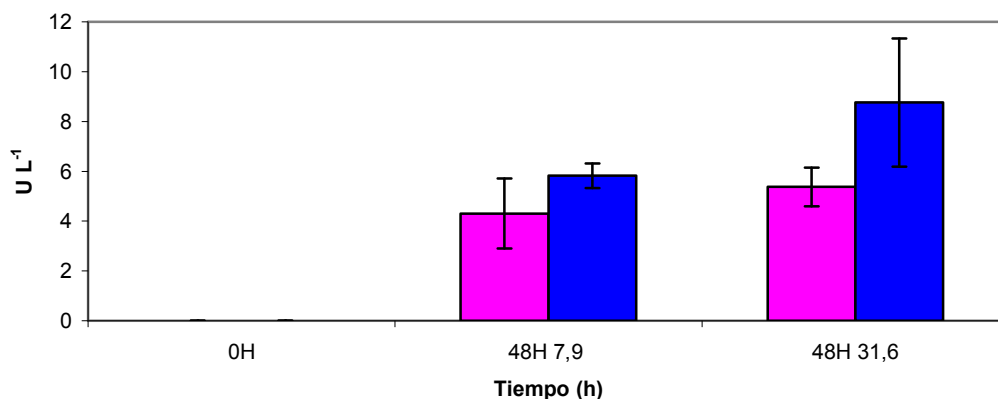
**Figura 62.** Curvas de biomasa generadas bajo las condiciones del apartado 19 (con  $7.9 g L^{-1}$  de metanol). En color azul ● se visualiza la curva generado por el modelo logístico para FMS. En color rosa ◆ se visualiza la curva de biomasa modelada para FML. También está representado la variación del pH, color negro para el FML y color naranja para FMS.



**Figura 63.** Curvas de biomasa generadas bajo las condiciones del apartado 19 (con 31.6 g L<sup>-1</sup> de metanol) En color azul ● se visualiza la curva generado por el modelo logístico para FMS. En color rosa ◆ se visualiza la curva de biomasa modelada para FML. También está representado la variación del pH, color negro para el FML y color naranja para FMS.

A continuación se muestran los datos de actividad enzimática generados a partir de las condiciones experimentales descritas en el apartado 19 (Fig. 64).

**Actividad enzimática FML/FMS 48 h**

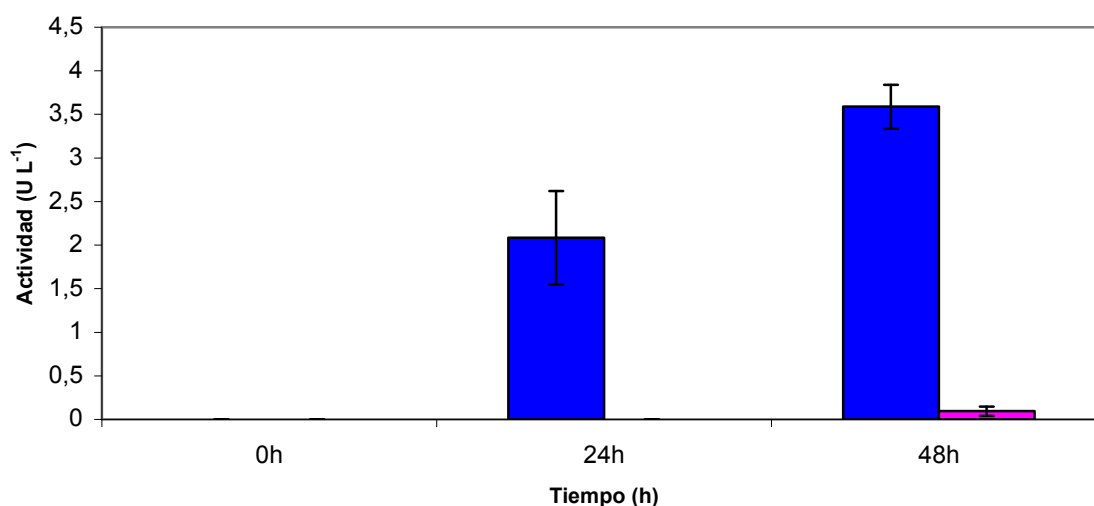


**Figura 64.** Valores de actividad enzimática encontrados bajo las condiciones experimentales descritas en apartado 19. En color azul se representan los datos para FMS y en color rosa se muestran los datos encontrados para FML. Las mediciones de actividad enzimática se realizaron a las 48 h de inducción utilizando metanol a una concentración de 7.9 y 31.6 g L<sup>-1</sup>.

**20 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD DE ATENUACIÓN DE LA TOXICIDAD GENERADA POR ALTAS CONCENTRACIONES DE METANOL SOBRE FERMENTACIONES SÓLIDAS Y LÍQUIDAS.**

## 20.1. Análisis de la capacidad de atenuación de la toxicidad sobre la expresión heteróloga

Hasta ahora, los resultados encontrados en este trabajo, nos condujeron a deducir que existe una respuesta diferencial para el metanol, en ambos tipos de fermentación referido a dos procesos. 1) **En cuanto a la expresión heteróloga** y 2) **En cuanto a la posible toxicidad provocada por este sustrato en el crecimiento**. Las causas que podrían estar provocando esta respuesta diferencial podrían estar relacionadas con factores como; la metodología utilizada en las fermentaciones en medio sólido para la incorporación del metanol, la evaporación de este sustrato, y la configuración de los agregados celulares embebidos en la espuma de poliuretano. Por lo tanto y con la finalidad de evaluar el efecto del metanol sobre la expresión heteróloga, se diseñó un experimento empleándose para ello una elevada concentración de metanol ( $63.2 \text{ g L}^{-1}$ ). A continuación, se muestra los valores de actividad enzimática encontrada bajo estas condiciones experimentales para ambos sistemas de fermentación (Fig. 65).



**Figura 65.** Valores de actividad enzimática encontrados bajo las condiciones experimentales descritas en el apartado 20. En color azul se representan los datos para FMS y en color rosa se muestran los datos encontrados para FML.

De los títulos de actividad enzimática encontrados, se deriva que las fermentaciones en medio sólido tuvieron una elevada capacidad de atenuación de la

toxicidad generada por metanol referida a la inhibición de la expresión heteróloga, comparada con las fermentaciones en medio líquido, las cuales tuvieron una inhibición total bajo esas mismas condiciones experimentales.

## 20.2. Análisis de la capacidad de atenuación de la toxicidad sobre el crecimiento

Con la finalidad de evaluar el efecto tóxico del metanol en el crecimiento, y analizar la respuesta diferencial sobre fermentaciones en medio sólido y medio líquido, se utilizaron los datos de biomasa, y los de glicerol remanente, recuperados de los experimentos descritos en el apartado 15 de resultados. Para ello se decidió comparar los valores de rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) entre ambos tipos de sistemas de fermentación. La siguiente tabla muestra las condiciones experimentales y los valores de  $Y_{x/s}$ . (Tabla 18).

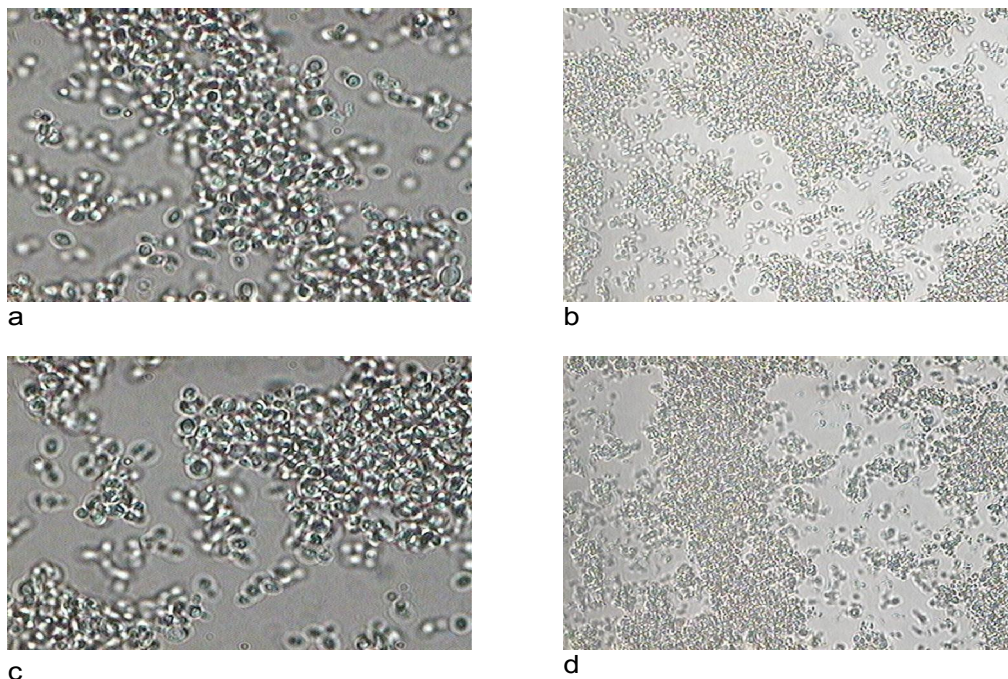
| Tratamiento | [Glicerol]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | [Metanol]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Rendimiento<br>g(x)/g(C) |
|-------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| FML         | 90.4                               | 0                                 | 1.17± 0.24 <sup>ab</sup> |
| FML         | 90.4                               | 7.9                               | 0.86± 0.25 <sup>a</sup>  |
| FMS         | 90.4                               | 0                                 | 1.48± 0.21 <sup>b</sup>  |
| FMS         | 90.4                               | 7.9                               | 1.14± 0.18 <sup>ab</sup> |

**Tabla 18.** Coeficientes de rendimiento encontrados ( $Y_{x/s}$ ).

Los resultados mostraron que las FMS tuvieron mayores rendimientos que las FML, tanto en fermentaciones donde el metanol no fue incorporado como en fermentaciones donde el metanol fue incorporado en  $t = 0$ . Por lo tanto las fermentaciones en medio sólido tuvieron una mayor capacidad de atenuación de la toxicidad provocada por metanol referida al crecimiento.

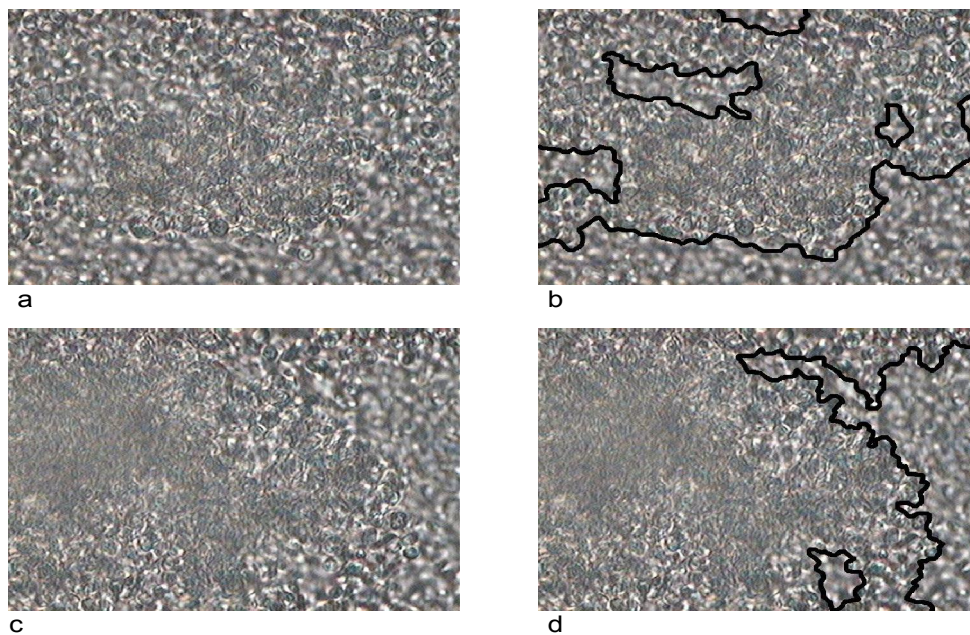
## 21. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA MORFOLOGÍA DE LOS AGREGADOS CELULARES FORMADOS EN FML Y FMS

Finalmente, y con el objetivo de extraer correlaciones entre los resultados obtenidos en los experimentos sobre la fisiología, en cuanto a la respuesta diferencial encontrada en ambos tipos de cultivo y correlacionarlas con los factores que se citaban en el apartado 20, se muestran a continuación, imágenes sobre la morfología de los agregados celulares conformados a lo largo de la cinética, evaluando la morfología a diferentes tiempos y con diferentes densidades celulares. Las imágenes tomadas para las fermentaciones sobre soporte sólido fueron realizadas sobre espuma de poliuretano y sobre portaobjetos, una vez exprimidos los agregados celulares mediante el procedimiento descrito en el apartado 17 de Materiales y Métodos. Las imágenes referidas al medio líquido se realizaron únicamente sobre portaobjetos. En la Fig. 66 se muestra la configuración de los agregados celulares a las 24 h de cultivo sobre medio BMG, para fermentaciones FMS. En las fotografías podemos observar grandes agregados celulares agrupados en un número superior a 200 o más, no encontrándose células libres o agrupadas en un número bajo de 2 ó 3 células.



**Fig. 66.** En la figura se muestran 4 ejemplos de la configuración de los agregados celulares sobre portaobjetos a diferentes aumentos a y c a 100x y b y d a 40x generados en FMS.

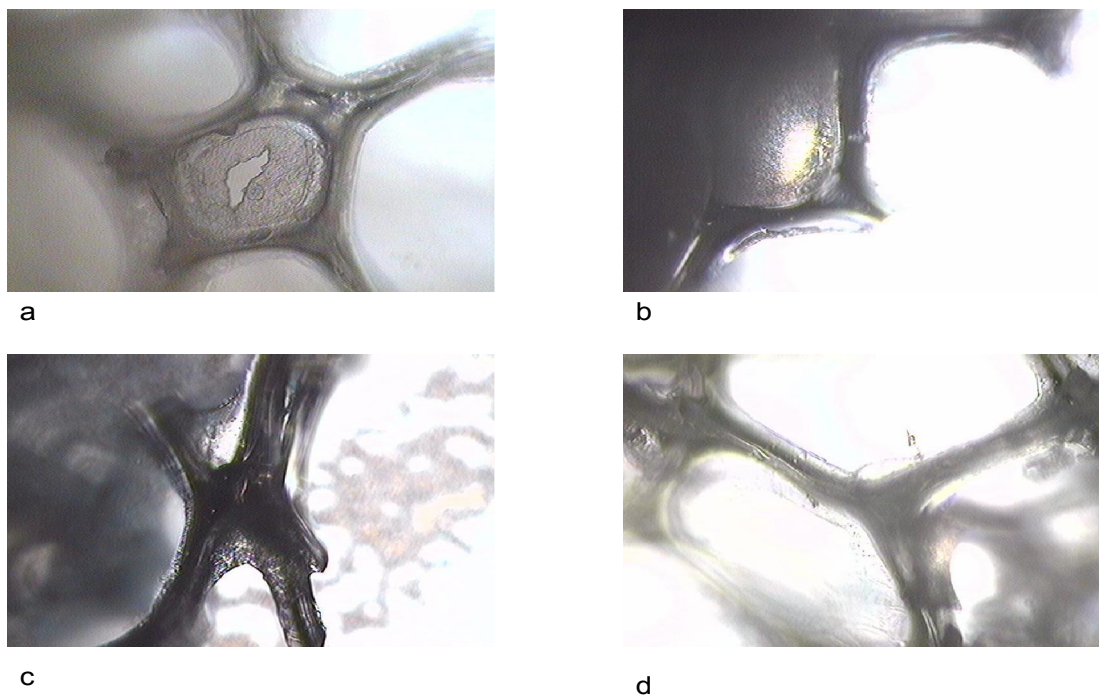
En la figura 67 se muestra a mayor aumento (100x) la configuración de los agregados procedentes de fermentaciones sobre soporte sólido, (96 h de cultivo) una vez exprimidos y extendidos sobre un portaobjetos. En las fotografías se resalta la superposición de capas de células que no se destruyen tras haber sido exprimidas de la espuma de poliuretano. En estas imágenes se pueden observar agregados de cientos de células. En estas imágenes los agregados fueron más grandes debido al tiempo que permanecieron creciendo, donde la densidad celular fue muy superior respecto de la densidad de las fotografías de la Fig. 66.



**Fig. 67.** En la figura se muestran dos ejemplos por duplicado, de capas formadas en medio sólido. En las figuras a y c se pueden observar la fotografía tomada directamente del portaobjetos, mientras que en las fotografías b y d se muestran los mismos ejemplos destacando la profundidad de campo, (haciéndose visible la superposición de capas mediante el contorno negro que se observa en la imagen editada). Las imágenes se realizaron con un aumento 100x de células cultivadas durante 96 h sobre medio BMG.

En la figura 68 se muestra la conformación de los agregados celulares generados sobre FMS en etapas más tardías del cultivo (96 h), igualmente sobre medio BMG pero directamente sobre el soporte sólido, la espuma de poliuretano. Este tipo de

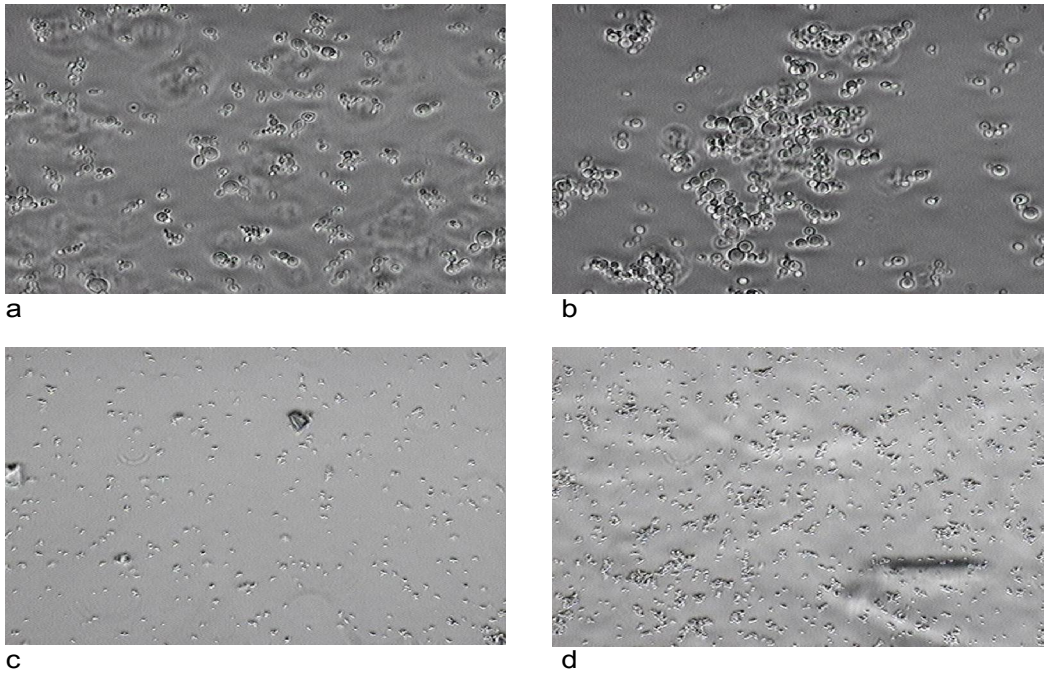
configuraciones se observaron durante toda la cinética encontrándose variaciones en cuanto al tamaño de los agregados celulares.



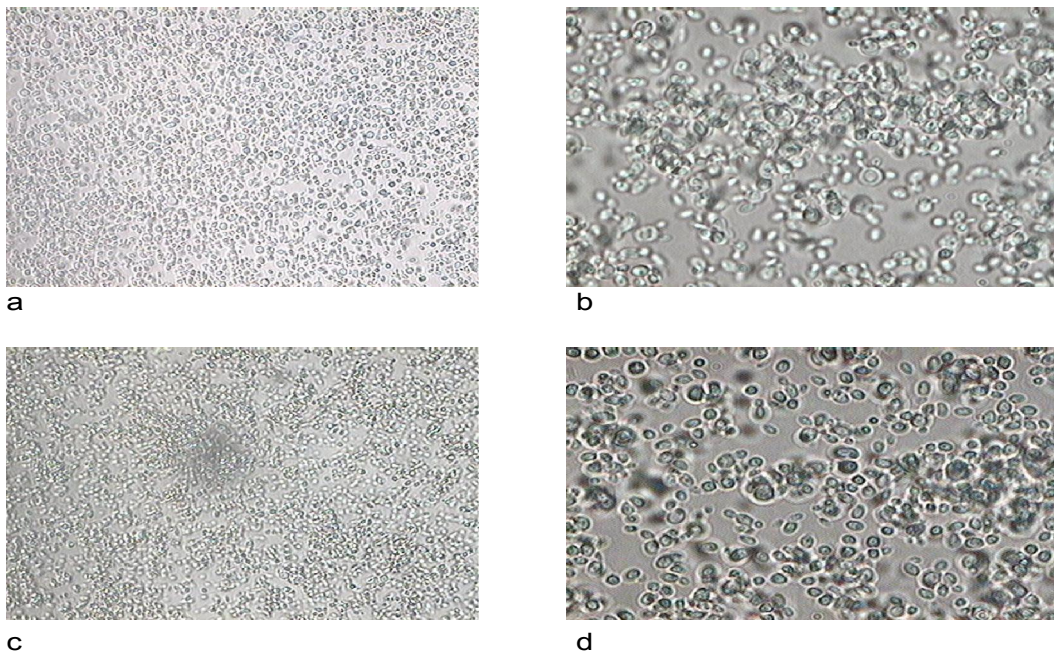
**Fig. 68.** a) Agregado sobre PUF aumentado 10x. b) Agregado sobre PUF aumentado 10x. c) Agregado sobre PUF aumentado 10x. d) PUF vacío aumentado 10x.

De la misma manera, y para los agregados celulares formados sobre fermentación en medio líquido se tomaron fotografías a diferentes tiempos. En la Fig. 69 se puede observar la configuración del cultivo en medio líquido a las (24 h), sobre medio BMG. Encontrando algún ejemplo de agregados celulares más pequeños que los encontrados en las Fig. 66 y 67 y células agrupadas en un número de dos o tres. Mientras que en la figura 70 se muestra la conformación de los agregados celulares (FML) a alta densidad (96 h), igualmente sobre medio BMG. En estas imágenes se percibe claramente como se incrementa la densidad celular del cultivo pero a diferencia de lo hallado en las fermentaciones sobre medio sólido, las células no se agregan formando capas, sino que permanecen dispersas en el medio.





**Fig. 69.** Ejemplos de la estructura de los agregados celulares a las 24 h de cultivo. Las fotografías a y b muestran las estructura a 100x, mientras que las fotografías c y d muestran la forma de los agregados a 40x.



**Fig. 70.** Ejemplos de la estructura de los agregados celulares a las 96 h de cultivo. Las fotografías a y c muestran las estructura a 40x, mientras que las fotografías b y d muestran la forma de los agregados a 100x

## DISCUSIÓN

En los últimos años, una gran cantidad de proteínas heterólogas se han expresado en *P. pastoris* incluyendo lacasas fúngicas (Jönsson y col., 1997; Cereghino y Cregg, 2000; Otterbein y col., 2000). Varias de las lacasas del hongo de pudrición blanca *T. versicolor* se han expresado de forma heteróloga en la levadura *P. pastoris*. (Jönsson y col., 1997; Gelo-Pujic y col., 1999; O'Callaghan, y col., 2002). El presente estudio fue diseñado para poder elucidar las posibles diferencias en cuanto a la fisiología del crecimiento (evaluando los parámetros de  $X_{\max}$ , y  $\mu$ ), y la expresión heteróloga de una lacasa, entre la fermentación en medio sólido y la fermentación en medio líquida en una cepa GS115 de *P. pastoris*. En trabajos previos en los que se realizó el estudio de la expresión heteróloga de una lacasa de *Fome lignosum* en *P. pastoris*, utilizando la fermentación en medio líquido, ésta alcanzó valores de  $9.07 \text{ U L}^{-1}$  (Liu y col., 2003). En este estudio los niveles de expresión encontrados no alcanzaron estos títulos de actividad, sin embargo la actividad enzimática heteróloga hallada, mostró diferencias significativas entre ambos sistemas de fermentación. Igualmente, no podemos excluir que la cantidad de lacasa producida difiera de la actividad lacasa medida, debido a los efectos que sobre esta proteína pudieran ejercer factores como la actividad proteasa (Cregg y col., 1993). Este efecto también podría provenir derivado de las proteasas emitidas por procesos de muerte celular. (Hong y col., 2002).

Una vez que se identificó la secuencia del cDNA del gen de lacasa de *T. versicolor* en las bases de datos, la estrategia fue que la proteína heteróloga se produjera de manera extracelular. Para cumplir con este criterio, se consideró como opción más plausible utilizar el péptido señal  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, ya utilizado en otros estudios, (Jönsson y col., 1997; Gelo-Pujic y col., 1999; Soden y col., 2002). Teniendo esto en cuenta, se diseñó una estrategia para clonar este gen de lacasa mediante un proceso de ligación de tres fragmentos, debido al factor condicionante de utilizar el plásmido

pPIC9 como vector de transformación. Tras el desarrollo de este proceso, se pudo medir actividad lacasa recombinante en placa, mediante la visualización de un halo característico de color verde producido por la oxidación del ABTS debido a la acción de la lacasa heteróloga (Fig. 29). Esta metodología también ha sido utilizada en otros trabajos con el mismo fin (Liu y col., 2003).

En varios trabajos publicados sobre expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris*, se utiliza como fuente de nitrógeno el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . (Liu y col., 2003, Martha Guerrero y col., 2007). En nuestros cultivos, debido a la prolongación de las cinéticas y a la propia fisiología de las levaduras, se alcanzaron valores de pH excesivamente ácidos, lo que nos llevó a inferir que este factor podía estar afectando tanto al crecimiento como a la producción y estabilidad de la lacasa heteróloga generada bajo estas condiciones. La utilización de urea como fuente de nitrógeno fue desestimada pese a ser sometida a análisis junto con otras fuentes de nitrógeno, (obteniéndose buenos resultados) por los posibles efectos caotrópicos que pudiera ocasionar sobre la lacasa recombinante. Los agentes caotrópicos interfieren con los enlaces no covalentes que mantienen la estructura tridimensional de la proteína, y pueden provocar su desorganización por transición a un estado conformacional desordenado. Evidentemente, ello conduce a una pérdida de actividad enzimática (Chang y Raymond, 1997). Por ello, se consideró la utilización de tartrato de amonio como fuente de nitrógeno más favorable para la consecución de este trabajo, ya que además de proporcionar diferencias en cuanto a la biomasa obtenida en ambos sistemas (FMS y FML), favorecía el mantenimiento del pH en unos niveles más cercanos a la neutralidad, eliminando el problema que planteaba el utilizar el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno. Esta hipótesis se corroboró cuando se compararon los valores de biomasa máxima obtenidos y los valores de pH alcanzados en ambos sistemas, encontrándose

valores superiores de biomasa y valores de pH menos ácidos, en condiciones de C/N balanceadas (Fig. 36). Este efecto se acentuó más en la fermentación sólida (probablemente porque la mayor producción de biomasa implique mayor utilización de este compuesto), y este consumo contribuiría a mantener el pH estable en el sistema de cultivo. También es posible que los agregados de levaduras sean muy sensibles a bajas concentraciones de nitrógeno, lo que afectaría dramáticamente al crecimiento. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que a medida que la relación C/N se incrementó, disminuyó la eficacia de la utilización del sustrato glicerol para producir biomasa, y este efecto se revirtió cuando la relación C/N se mantuvo constante (incrementándose la cantidad de nitrógeno cuando se adiciona más glicerol en el medio).

En trabajos en los cuales se probaron diferentes estrategias para mejorar la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*, se utilizaron diferentes concentraciones de metanol (Hong y col., 2000). Sin embargo, en estos trabajos no se analizó la posible producción asociada al crecimiento. En el presente estudio, se diseñó un experimento para analizar la producción de proteína recombinante asociada al crecimiento, (Fig. 38 ay b) así como las condiciones de crecimiento específicas en cada sistema. Sin embargo, en ninguno de los medios se midió actividad lacasa. Las inferencias que de aquí se pueden extraer son tres. **1)** La cantidad de glicerol en el medio en el momento de la inducción es demasiado alta, por lo que el promotor *AOXI* se encuentra reprimido y el gen no se expresa, como ya se ha descrito en otros trabajos para fermentaciones en medio líquido (Higgins y Cregg, 1998). **2)** En cultivos en medio sólido la biomasa potencialmente productora de lacasa es demasiado baja en el inicio del cultivo como para que la actividad enzimática sea detectable al final de la fermentación. **3)** En cultivos en medio sólido, cuando la biomasa es suficiente para

producir actividad lacasa detectable, el metanol adicionado al principio se ha evaporado y por lo tanto no puede actuar como inductor, lo que tiene como consecuencia de nuevo la ausencia de actividad lacasa heteróloga.

En la segunda parte de este experimento se realizó la misma fermentación pero en este caso no se incorporó metanol al medio, (Fig. 39 a y b) con el objetivo de someter a análisis el comportamiento del mismo cultivo en cuanto a producción de biomasa, evolución del pH y velocidad de crecimiento. De los resultados obtenidos, se deriva que para ambas condiciones de adición de metanol, (con y sin metanol) la fermentación en medio sólido resultó ser mejor en cuanto a la producción de biomasa, asimismo los valores de pH encontrados fueron más ácidos en los dos casos para las cinéticas sobre medio sólido. Estos datos, mantienen la tendencia encontrada en experimentos precedentes y podrían ser explicados por el hecho de que cantidades de biomasa superiores generan mayor cantidad de compuestos susceptibles de variar el pH haciéndolo más ácido.

La siguiente fase del trabajo se construyó con base en las hipótesis extraídas del experimento anterior, teniendo como criterio fundamental que la presencia de glicerol en el medio actúa como agente fundamental de la represión del gen *lac1* mediante el promotor *AOX1*. (Higgins y Cregg, 1998). Las conclusiones que se desprenden de los resultados obtenidos, mantienen la misma línea de tendencia hasta ahora observada en cuanto a la eficiencia de producción de biomasa a partir de una misma cantidad de sustrato, sin embargo podemos añadir a este análisis una observación interesante: la actividad enzimática fue observada una vez retirado el glicerol del medio mediante centrifugación e incorporación de medio libre de este sustrato, lo que confirma lo establecido anteriormente (Fig. 40, Tabla 6). Pero además, la concentración óptima de metanol ( $7.1\text{ g L}^{-1}$ ) para las fermentaciones en medio líquido, tuvo una mayor eficiencia

en la producción de lacasa heteróloga por gramo de biomasa, mientras que el cultivo sólido tuvo un comportamiento más o menos constante en cuanto a la producción, independientemente de la cantidad de metanol que se incorporó al medio, Estos resultados podrían estar ocasionados por la configuración de los agregados celulares embebidos en la espuma de poliuretano, así como la propia espuma de poliuretano, y la forma de incorporación del metanol en forma volátil mediante un atomizador, que podría estar provocando que una cantidad de células más o menos constante estuviera expuesta al metanol (lo que tendría como consecuencia esta respuesta uniforme).

La consecuencia de las inferencias hasta ahora establecidas a partir de los datos arrojados por los experimentos llevó a diseñar una estrategia en la cual no se destruyesen los agregados celulares formados en el medio sólido. Al mismo tiempo, la presencia de glicerol en el medio debería ser tan baja que permitiera producción de proteína heteróloga. Para ello se decidió mantener los cultivos en medio BMG el tiempo suficiente para que el glicerol fuese consumido completamente, permitiendo la inducción de la expresión heteróloga mediante la incorporación de metanol en ese medio.

De estos resultados, se puede concluir que la alta relación A/V de un líquido fermentable disperso en espuma de poliuretano de baja densidad tuvo un efecto muy favorable en el crecimiento, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los valores hallados para las condiciones experimentales en las que se utilizaron 9.03 y 32.64 g L<sup>-1</sup> de glicerol respectivamente, sin embargo si se encontraron importantes diferencias cuando se utilizó 90.4 g L<sup>-1</sup> de glicerol. (En este caso, el cultivo en medio sólido llegó a producir 55 g L<sup>-1</sup> (Fig. 51). Estos resultados indican que la necesidad de utilizar aireación forzada en el medio de cultivo se reduce

drásticamente, pudiéndose obtener cultivos de alta densidad celular, sin la necesidad de agitación mecánica.

En las fermentaciones líquidas, la relación A/V es mucho más baja, lo cual condiciona que la disponibilidad de oxígeno para las células sea mucho menor (Viniegra González y col., 2003). Este hecho afectó directamente al crecimiento y, por lo tanto, al valor de biomasa máxima alcanzada en estos cultivos.

Por otra parte, teniendo en cuenta la conformación de las fermentaciones en medio sólido, se decidió utilizar un atomizador para incorporar el inductor al medio, pensando que podría ser una mejor forma para repartir homogéneamente el metanol. El metanol introducido mediante un atomizador, permitió la inducción de la expresión heteróloga sin la desintegración de los agregados celulares. Lo que tuvo como consecuencia reseñable que estos cultivos fueron capaces de atenuar los efectos tóxicos que podría ocasionar el metanol en altas concentraciones ( $62.2 \text{ g L}^{-1}$ ) (Fig. 65). La consecuencia de la morfología de estos cultivos posiblemente tuvo otros efectos ya que el bajo rendimiento encontrado (unidades de actividad enzimática por gramo de biomasa) pudo ser debido a que el metanol no fue capaz de penetrar al interior celular, Esto supondría que existen problemas de difusión asociados a la dispersión del metanol en forma volátil al interior de las células, o que la propia configuración de grandes agregados celulares dificulte el paso del metanol, penetrando únicamente en las células situadas en el exterior del agregado. En las fermentaciones en cultivo líquido, por el contrario, la alta solubilidad del metanol en el medio acuoso, ayudado por la agitación, permite una difusión uniforme del inductor a toda la masa celular, lo que explica los altos rendimientos de producción de enzima heteróloga por gramo de biomasa generada, en comparación con los cultivos en fermentación sólida (Tabla 17). Sin embargo, el gen *AOX1* es muy sensible a bajas concentraciones de oxígeno, (Higgins y



Cregg, 1998) lo que obliga a introducir oxígeno puro en los cultivos en fermentación en medio líquido, con el consiguiente coste económico que ello conlleva.

Los datos resultantes de las condiciones experimentales recogidas en la tabla 7 fueron sintetizados en diagramas de superficies de respuesta. La producción de biomasa siguió una relación lineal con respecto a la cantidad de sustrato utilizada en ambos sistemas de fermentación (Fig. 56 y 57). Sin embargo, la producción de proteína heteróloga, se observa una relación no lineal, a diferencia de la observada para la generación de biomasa como variable de respuesta, cuando se utiliza 4% (v/v) de metanol como inductor (Fig. 58 y 59). Este resultado podría ser explicado por el hecho que el tiempo en el cual el cultivo se mantiene en presencia de glicerol, en este caso 72 h, podría no ser suficiente para que el glicerol desaparezca completamente del medio. En estas condiciones, podría ocurrir que las cantidades traza de glicerol provocarían eventos de represión.

Para comprobar estas hipótesis, y evaluar el potencial de producción de las células incubadas en medio sólido, se diseñó un experimento en el cual se mantuvieron las condiciones que generaban las diferencias ya vistas, y se introdujo una nueva fuente de variación que consistió en inducir las células generadas en medio sólido, en medio líquido, para analizar la destrucción de los agregados celulares mediante agitación y evaluar ese efecto sobre la biomasa máxima y, fundamentalmente, sobre el valor de rendimiento de unidades de actividad enzimática heteróloga por gramo de biomasa (Tabla 17). Los resultados que aportaron estos experimentos dan a entender que el estado de agregación celular condiciona el valor de rendimiento. Ya que fue mayor cuando las células se encuentran dispersas y en agitación en un cultivo sumergido (53%). Por otra parte, la formación de grandes agregados de levaduras reduce los efectos sobre el metabolismo celular, tanto en la inhibición del crecimiento como en la

inducción de una enzima con un promotor específico para este sustrato. Como el menor efecto inductor del metanol en el medio sólido se revirtió mediante la agitación, se puede relacionar con problemas difusionales asociados al estado de agregación de las células y no a cambios permanentes del metabolismo. Esto se sustenta en el hecho que cuando el estado de agregación cambia de grandes agregados a grupos pequeños de células, formados debido a la agitación, los valores de rendimiento pasan a no tener diferencias estadísticamente significativas entre las células incubadas e inducidas en medio líquido, comparadas con las células incubadas en medio sólido e inducidas en medio líquido (Tabla 17).

El comportamiento de  $\mu$  (Fig. 60 y 61), coincidió en ambos sistemas de fermentación. Encontrándose que  $\mu$  disminuyó a medida que la concentración de glicerol inicial se incrementó. Sin embargo, en fermentaciones en medio sólido, la disminución de  $\mu$  fue mucho menor. Esto podría ser explicado por dos posibles mecanismos: a) Que la regulación del transporte del sustrato (glicerol) se modifique en medio sólido, a través de cambios en la permeabilidad de la membrana (Maldonado y col., 2002), y b) Que en medio sólido el fenómeno de difusión del sustrato a través de la membrana es menor, viéndose esta variable menos afectada en medio sólido cuando las levaduras crecen a altas concentraciones de glicerol. Otra de las explicaciones podría ser la formación de microgradientes de concentración alrededor de los agregados celulares, modulándose de esta manera la penetración del sustrato al interior celular. (Viniegra y Favela, 2006)

Finalmente, estas consideraciones fueron sustentadas por un análisis de imágenes, que corroboró la estructura diferencial respecto de la agrupación celular entre cultivos sumergidos y cultivos sólidos. En las imágenes, (Fig. 66, 67 y 68) se pueden observar que las células incubadas sobre soporte sólido tienen dos características importantes: a)

que el número de células que componen los agregados es mayor de 100, y b) que se disponen en capas finas a lo largo de los miles de meniscos que proporciona la superficie porosa de la espuma de poliuretano, incrementándose en un orden de magnitud la relación A/V, y proporcionando consecuentemente una mayor accesibilidad al oxígeno, lo cual comportó las referidas diferencias encontradas en cuanto a generación de biomasa máxima. La estructura celular del cultivo en medio líquido se caracteriza por estar compuesta de grupos pequeños, que apenas sobrepasan las 20 células (Fig. 69 y 70). Esta configuración se debe fundamentalmente a la agitación de los matraces, lo que tiene como consecuencia directa la homogeneización de los componentes del medio en el cultivo, incluido el metanol. Estas imágenes nuevamente confirman el claro condicionamiento que ejercen, sobre el crecimiento y la producción de proteína heteróloga, la relación A/V que diferencia el medio sólido del medio líquido.

Otro de los puntos que pareció interesante considerar, fue comparar el valor de rendimiento de gramos de biomasa generado por gramo de carbono presente en el medio. ( $Y_{x/s}$ ) La razón de este análisis, fue debido a que el medio de cultivo contaba con dos fuentes de carbono, el glicerol y el tartrato de amonio. En la mayoría de trabajos publicados es el glicerol lo que se utiliza como fuente de carbono (Hong y col., 2000) El hecho de que el tartrato de amonio también aporte carbono al medio obligó a realizar este análisis, ya que considerar únicamente el consumo de glicerol podría sesgar los resultados. Para llevar a cabo este análisis se utilizaron los experimentos descritos en la sección 14 y 15 de resultados, suponiendo además que el metanol no fue utilizado por los cultivos (esto se soporta además por el hecho de que no se detectó actividad enzimática heteróloga). Los datos indican que el comportamiento de los cultivos, en cuanto a utilización del carbono procedente de dos fuentes de carbono diferentes,

durante la fase no inductiva de fermentación, fueron similares, lo que lleva a pensar que la fisiología celular es un factor determinante en la eficiencia de conversión del carbono en biomasa, incluso más que la morfología de la superficie donde crecen, independientemente de la accesibilidad al oxígeno que proporciona el medio sólido.

El comportamiento en cuanto a crecimiento observado, podría ser debido a la heterogeneidad con el que el medio sólido dispone los componentes del medio líquido que en él se vierten, lo que puede configurar una superficie con multitud de gradientes que podrían afectar al crecimiento de gran parte del cultivo. (Viniegra y col., 2003), que en el caso de este trabajo resultó en un efecto positivo, ya que estos cultivos crecieron más. Por el contrario, este efecto de la heterogeneidad en los gradientes no se da en cultivo líquido, lo que puede explicar los resultados encontrados.

Los resultados de este trabajo dejan claro que las diferencias físicas entre los cultivos en medio sólido y medio líquido, fundamentalmente, la relación A/V, y la rugosidad del medio sólido que configura una estructura de agregados celulares diferencial con respecto al medio sumergido, condicionaron aspectos de la fisiología de las levaduras, encontrando claras diferencias tanto en el crecimiento, la producción de biomasa así como en la expresión heteróloga de una lacasa inducida por metanol.

## CONCLUSIONES

1<sup>a</sup>) La elevada relación del cociente A/V de un líquido fermentable disperso en poliuretano de baja densidad tiene un efecto muy favorable sobre el crecimiento de las levaduras, especialmente cuando se utilizan concentraciones de sustrato mayores de 50 g L<sup>-1</sup>. De esta forma, se reduce la necesidad de transferencia forzada de oxígeno al medio de cultivo y se facilita la obtención de cultivos de alta densidad celular, sin agitación mecánica.

2<sup>a</sup>) La formación de grandes agregados de levaduras reduce los efectos sobre el metabolismo celular, tanto en la inhibición del crecimiento como en la inducción de una enzima con un promotor específico para a este sustrato (metanol). Como el menor efecto inductor del metanol en el PUF se revirtió mediante la agitación, se puede concluir que dicho problema se relaciona con dificultades difusionales asociados al estado de agregación de las células y no con cambios permanentes del metabolismo.

## PERSPECTIVAS

El desarrollo de esta tesis se inició con el propósito de caracterizar la fisiología del medio sólido de *P. pastoris*, además de asociar este comportamiento fisiológico con la expresión de una enzima heteróloga. Esta enzima de producción heteróloga (lacasa) tiene una gran demanda industrial debido a sus múltiples aplicaciones.

La producción de biomasa de los sistemas de fermentación en medio sólido fue muy superior al rendimiento alcanzado por los sistemas de fermentación en medio líquido, lo que podría tener utilidad en la industria, debido al problema que supone la difusión del oxígeno en la generación de biomasa en los sistemas de fermentación en medio líquido, (que precisa la inyección de oxígeno puro, con el coste económico que ello conlleva). El desarrollo de esta tesis supone el primer paso para reducir este coste en la generación de cultivos de alta densidad celular, con las repercusiones que ello pudiera tener en toda la industria que rodea a *P. pastoris*, involucrando toda la producción de proteínas de origen heterólogo.

En futuros trabajos, la explicación del comportamiento fisiológico desde la perspectiva de la biología molecular podría ayudar a optimizar el sistema de generación biomasa en medio sólido. La otra aproximación de gran interés que se deriva de esta tesis y que podría desarrollarse en futuros trabajos, se refiere a la explicación molecular en la penetración del inductor al interior celular en sistemas de fermentación en medio sólido, lo que combinado con la generación de biomasa, podría utilizarse para la producción de proteínas heterólogas de un modo más eficiente que como actualmente se está realizando.



## BIBLIOGRAFÍA

**Addleman, K. and Archibald, F.** (1993) Kraft pulp bleaching and delignification by dikaryons and monokaryons of *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 266–273.

**Aramayo, R. and Timberlake, W. E.** (1990). Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* (laccase 1) gene. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3415

**Archibald, F.** (1992). The role of fungus-fiber contact in the biobleaching of kraft brownstock by *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Holzforschung* **4**:305-310.

**Barr, K. A., Hopkins, S. A. and Sreekrishna, K.** (1992). Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharm. Eng.* **12**: 48-51.

**Berka, R. M., P. Schneider, E. J. Golightly, S. H. Brown, M. Madden, K. M. Brown, Halkier, T., Mondorf, K. and Xu, F.** (1997). Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3151-3157

**Bollag, J. M. and Leonowicz, A.** (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 849-854

**Bourbonnais, R. and Paice, M. C.** (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. *FEBS Lett.* **267**: 99-102

**Brankamp, R., Sreekrishna, K., Smith, P., Blankenship, D. and Cardin, A.** (1995). Expression of a synthetic gene encoding the anticoagulant-antimetastatic protein ghilanten by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expres. Purif.* **6**: 813-820.

**Brenda Valderrama, Patricia Oliver, Arturo Medrano-Soto and Rafael Vazquez-Duhalt.** (2003). Evolutionary and structural diversity of fungal laccases *Antonie van Leeuwenhoek* **84**: 289–299.

**Brierley, R. A., Bussineau, C., Kosson, R., Melton, A. and Siegel, R. S.** (1989). Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene bovine lysozyme. *Ano. NY Acad. Sci.* **589**: 350-362.

**Brierley, R., Davis, G and Holtz, G** (1994). Production of insuline-like growth factor 1 in methylotrophic yeast cells. *United State Patent*, No. **5,324,639**.

**Brown, M. A., Zhao, Z. and Mauk A. G.** (2002). Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*, *Inorg. Chim. Acta.* **331**: 232-238

**Brown, A. D.** (1974). Microbiol water relations: features of intracellular composition of sugar tolerant yeast. *J Bacteriol* **118**:769-777

**Buckholz, R. G. and Gleeson, M. A.** (1991). Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins; *Biotechnology.* **9**: 10671072.

**Burkhard Horstkotte, Carolina Arnau, Francisco Valero, Olaf Elsholz and Víctor Cerdà** (2008) Monitoring of sorbitol in *Pichia pastoris* cultivation applying sequential injection analysis. *Biochemical Engineering Journal* **42**: 77-83

**Cécilia Eydoux, Josiane De Caro, Francine Ferrato, Paul Boullanger, Dominique Lafont, René Laugier, Frédéric Carrière, and Alain De Caro** (2007) Further biochemical characterization of human pancreatic lipase-related protein 2 expressed in yeast cells. *Journal of lipid Research.* **48**: 1539-1549

**Cereghino, J. L. and Cregg, J. M.** (2000). Heterologous, protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* **24**(1): 4566.

**Chang, and Raymond** (1997) Química, cuarta edición, primera edición en español, McGraw-Hill, España.

**Chan Woo Chung, Jinsun You, Kyeongyeon Kim, Yuseok Moon, Hoon Kim and Jung Hoon Ahn** (2009). Export of recombinant proteins in *Escherichia coli*

using ABC transporter with an attached lipase ABC transporter recognition domain (LARD). *Microbial Cell Factories* **8**:11-19

**Chen, Y., Cinc, L., Hast, G, Freedman, D., White, I. and Komives, E. A.** (1997). High expression in fermentation of recombinant *Pichia pastoris* by a fed-batch process. *Process Biochem.* **32**: 107111.

**Choi, G. H., Larson, T .G. and Nuss, D. L.** (1992). Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in a isogenic hypovirulent strain. *Molecular plant- Microbe interaction*, **5**, 119-128

**Christen, P., Auria, R., Villegas, E. and Revah, S.** (1993). Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotechnology Advances.* **11**: 549-557.

**Claus, H.** (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **179**: 145-150

**a Clare, J. L., Rayment, F. B., Bollantine, S. P., Sreekrishna, K. and Romanos, M. A.** (1991a). High level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology.* **9**: 455-460.

**b Clare, J. J., Romanos, M. A., Rayment, F. B., Rowedder, J. E., Smith, M. A., Payne, M. M., Sreekrishna, K. and Henwood, C. A.** (1991b). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strain containing multiple genes copies. *Gene.* **105**: 205-212.

**Collins, P.J., Kotterman, J.A., and Dobson A.D.W.** (1996). Oxidation of anthracene and benzo ( $\alpha$ ) pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl Environ. Microbiol.* **62**: 4563- 4567.

**Cregg, J. M., Barringer, K. L., Hessler, A. Y. and Madden, K. R.** (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations *Mol. Cell. Biol.* **5**(12): 3376-85.

**Cregg, J. M., Tschopp, J. F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W. S., Buckholz, R. G., Madden, K. R., Kellaris, P. A., Davis, G. R., Smily, B. L., Cruze, L., Torregrosa, R., Velicelebi, G and Thill, G. P.** (1987). High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology*. **5**: 479-485.

**Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P. and Stillman, C. A.** (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*. **9**(3): 1316-23.

**Cregg, J. M., Vedvick, T. S. and Rascke, W. C.** (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*. **1**: 905-910.

**Damell, J., Lodish, H. and Baltimore, D.** (1990). In: Molecular cell biology. Ed. Scientific American Books; Segunda edición. pp 439-440.

**Demain, A. L. and Davies, J. E.** (1996). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology; Washintong D.C., USA: Editorial ASM Press. 400.

**Diamantidis G., Effosse A., Potier P. and Bally R.** (2000). Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 919–927.

**Dice, J. F.** (1987). Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells. *FASEB J.* **1** (5): 349357.

**Digan, M. E., Laair, S. V., Brierly, R. A., Siegel, R. S., Williams, M. E., Ellis, S. B., Kellaris, P. A., Prorow, S. A., Craig, W. S., Velicelebi, G., Harpold, M. M. and Thill, G. P.** (1989). Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology*. **7**: 160-164.

**Distel B, Veenhuis M, Tabak H. F.** (1987) Import of Alcohol Oxidase Into Peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*; **6**: 3111-16.

**Doelle, H. W., Mitchell D. A. and Rolz C. E.** (1992). Solid Substrate Cultivation. *Elsevier Applied Science*, London, N. York, Chapter 3, 35

**D'Souza, T.M., Boominathan, K., and Reddy, C.A.** (1996) Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3739-3744.

**Durand, A., de la Broise, D. and Blachere, H.** (1988). Laboratory scale bioreactor for solid stated processes. *J. Biotechnology* **8**: 59-66.

**Eggert, C., Temp, U., and Eriksson, K.E.** (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1151–1158.

**Eggert, C., LaFayette, U. Temp, Eriksson, K. E. and Dean J. F.**(1998). Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1766-1772

**Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A. F., Harpold, M. M. and Gingeras, T. R.** (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **5(5)**: 1111 - 112 1.

**Escamilla-Treviño, L. L, Viader-Salvadó, J. M. and Guerrero-Olazarán, M.** (1999). Producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. *CIENCIA UANL* **2(2)**: 27-33.

**Evers, M., Harder, W. and Veenhuis, M.** (1995). In Vitro Dissociation and Re-assembly of Peroxisomal Alcohol Oxidases of *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris*. *FEBS Let.*; **368**: 293-96.

**Fernández-Larrea, J. and Stahl, U.** (1996). Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 539-551

**Freeman. J.C., Nayar, P.G., Begley, T.P., and Villafranca, J.J.** (1993)

Stoichiometry and spectroscopic identity of copper centers in phenoxazonine synthase: a new addition for the blue copper oxidase family. *Biochemistry* **32**:4826–4830

**F. Villaseñor, O. Loera, A. Campero, G. Viniegra-González.** (2004) Oxidation of dibenzothiophene by laccase or hydrogen peroxide and deep desulfurization of diesel fuel by the latter. *Fuel Processing Technology*. **86**:49-59.

**Gancedo, J. M.** (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Bio Rev* **62**:334-361

**Gavel, Y. and Von Heijne, G.** (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* **3**, 433-442.

**Gellisen, G.** (2000) Heterologous Protein Production in Methylophilic Yeasts. *App Microbiol Biotechnol*. **54**: 741-50.

**Gelo-Pujic, M., Kim, H. H., Butlin, N. G., and Palmoteo G. T. R.** (1999) Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. *Appl Environ. Microbiol*. **65**: 5515-5521.

**Germann, U. A., Muller, G., Hunziker, P. E. and Lerch, K.** (1988). Characterization of 2 allelic forms of *Neurospora crassa* laccase amino-terminal and carboxyl-terminal processing of a precursor. *J Biol. Chem*. **263**: 885-896

**Gianfreda L., Xu, F. and Bollag J. M.** (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J*. **3**: 1–25.

**Giardina, P. R., Cannio, L. Martitrani, L. Marzullo, G. Palmieri, and G. Sannia.** (1995). Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol*. **61**: 2408-2413.

**Gleeson, M. A. and Sudbery, P. E.** (1988). The methylophilic yeasts. *Yeast*. **4**: 1-5.

**Ghosalkar, A., Sahai V, and. Srivastava A** (2008) Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production. *Bioresource Technology* **99**: 7906-7910.

**Gómez-Alarcón G., Lahoz R. and Molina D.** (1989). Production of extracellular enzymes during growth and autolysis of *Pycnoporus cinnabarinus*. *J. Basic Microbiol.* **29**: 23–29.

**Hans R. Waterham, Kimberly A. Russell, Yne de Vries, and James M. Cregg** (1997). Peroxisomal Targeting, Import, and Assembly of Alcohol Oxidase in *Pichia pastoris* *Journal of Cell Biology*, Volume 139, Number **6**: 1419-1431

**Hatakka, A.** (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white- rot fungi, production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**: 125–135

**Hesseltine, C.W.** (1972). Solid State Fermentations. *Biotechnol. and Bioeng.* **14**: 517 – 532.

**Higgins, D. R. and Cregg, J. M.** (1998). *Pichia* protocols. Methods in Molecular Biology. Vol. 103. Humana Press.

**Holst, B., Lunde, C., Lages, F., Oliveira, R., Lucas, C., and Kielland-Brandt, M.C.** (2000) GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **37**:108–124

**Hong F., Meinander, N. Q. and Jönsson, L. J.** (2002) Fermentation strategies for improved heterologous experssion of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* **79**:438-449.

**Hullo M. F., Moszer I., Danchin A. and Martin-Verstraete, I.** (2001). Cota of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent enzyme. *J. Bacteriol.* **183**: 5426–5430.



**Inan, M. and Meagher, M.M.** (2001). The Effect of Ethanol and Acetate on Protein Expression in *Pichia pastoris*. *J Biosc Bioeng.*; **92** (4): 337-41.

**Invitrogen. Pichia Expression Kit. Protein Expression.** A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *P. pastoris*. Cat. No. K1710-01. 1996; California: Invitrogen.

**Jönsson, L. J., Saloheimo, M. and Penttilä, M.** (1997) Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris*. *Current genetics*. **32**(6):425-30.

**Johnson M. A., Waterham H. R., Ksheminska G. P., Fayura L. R., Cereghino J. L., Stasyk, O. V., Veenhuis, M., Kulachkovsky, A. R., Sibirny, A. A. and Cregg, J. M.** (1999). Positive Selection of Novel Peroxisome Biogenesis-Defective Mutants of the Yeast *Pichia pastoris*. *Genet.*; **151**: 1379-91.

**Katakura, Y., Zhang, W., Zhuang, G., Amasa, T., Kishimoto, M., Goto, Y. and Suga, K.** (1998). Effect of methanol concentration on the production of human  $\beta$ -Glycoprotein 1 domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor *J. Ferment Bioeng.* **86**:482-487.

**Kawai S, Umezawa T, and Higuchi T** (1988a) Degradation mechanism of phenolic b-1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. *Arch Biochem Biophys* **262**: 99-110.

**Klaus Piontek, Matteo Antorini and Thomas Choinowski** (2002) Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 37663-37669.

**Kobayashi K Shinobu Kuwae, Tomoshi Ohya, Toyoo Ohda, Masao**

**Ohyama and Kenji Tomomitsu** (2000) Addition of Oleic Acid Increases Expression of Recombinant Humal Serum Albumin by the *AOX2* Promoter in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **89**: 479-484

**Koutz, P., Davis, G., Stillma, C., Barringer, K., Cregg, J. and Thill, G.** (1989). Structural Comparison of the *Pichia pastoris* Alcohol Oxidase Genes. *Yeast.*; **5**: 167-77.

**Kwang-Soo Shin** (1995). Oxidation of syringic acid by extracellular peroxidase of white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience* **36**: 31-35.

**Lages, F. and Lucas, C.** (1995). Characterization of a glycerol/H<sup>+</sup> symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. *Yeast*. Feb;**11**(2):111–119.

**Laroche, Y., Storme, V., Meutler, J., Messens, J. and Lauwereys, M.** (1994). High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tichk anticoagulant peptide (TAP) expressed in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology*. **12**: 1119-1124.

**Lee, J. D. and Komagata, K.** (1980). Taxonomic study of methanol-assimilating yeast *J. Gen Appl. Microbio*. **26**: 133-158.

**Leonowicz A., Cho N. S., Luterek J., Wilkolazka A., Wasilewska M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D. and Rogalski J.** (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol*. **41**: 185–227.

**Liu, W., Chao, Y. Liu, S., Bao, H. and Qian, S.** (2003) Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fome lignosus* and expression in *Pichia pastoris* *Appl Microbiol Biotechnol* **63**:174–181

**Loera Corral Octavio, Pérez Pérez M<sup>a</sup> Cristina Irma, Barbosa Rodríguez Juan Ricardo and Villaseñor Ortega Francisco.** (2006) Laccases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology* 323-340 ISBN: **81-7736-269-0**

**Loewen, M. C., Liu, X., Davies, P. L and Daugulis, A. J. (1997).** Biosynthetic production of type II anti-freeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **48**: 480-486.

**Lucas, C, Da Costa, M. and Van Uden, N. (1990).** Osmoregulatory active sodium-glycerol cotransport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **6**:187-191.

**Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J (2001).** Molecular Cloning: A laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Press.

**Marcos López, Octavio Loera, Martha Guerrero-Olazarán, José M<sup>a</sup> Viader-Salvadó, Juan A. Gallegos-López, Francisco J. Fernández, Ernesto Favela-Torres and Gustavo Viniestra-González (2009)** Cell growth and *Trametes versicolor* laccase production in transformed *Pichia pastoris* cultured by solid-state or submerged fermentations. *J Chem Technol Biotechnol*. Published on line.

**Martha Guerrero Olazarán y José M. Viader Salvadó.** *Pichia pastoris* como hospedero para la producción de proteínas recombinantes. ISBN **970-694-131-2**

**Martha Guerrero Olazarán , Lili Rodríguez Blanco , José M<sup>a</sup>. Viader Salvadó (2007)** Producción de una fitasa recombinante en *Pichia pastoris*. Ciencia UANL / VOL. **X**, No. 4

**Martins, L. O., Soares, M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H., and Henriques A. O. (2002).** Molecular and biochemical characterization of highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J Biol. Chem.* **277**: 18849-18859

**Mayer, A. M. (1987).** Polyphenol oxidases in plants recent progress. *Phytochemistry* **26**: 11–20.

**Mayer, A. M. and Staples R. C. (2002).** Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**: 551–565.

**M. C. Maldonado, S. Cáceres, E. Galli and A. R. Navarro** (2002) Regulation of the production of polygalacturonase by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica* **9**: 101-110.

**Mehmet Inan and Michael M. Meagher** (2001) Non-Repressing Carbon Sources for Alcohol Oxidase (*AOX1*) Promoter of *Pichia pastoris* *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **92**:585-589

**Messerschmidt A. and Huber R.** (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.* **187**: 341–352.

**Moo-Young, M., Moreira, A. R., and Tengerdy R. P.** (1983). Principles of the Solid Substrate Fermentation. In *Filamentous Fungi*. 4. Ed. J. E. Smith, D. R. Berry and B. Kristiansen, Edward Arnold, 117 – 144.

**Mudgett, R. E.** (1986). Solid State Fermentation. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed: Demain. M<sup>c</sup> Graw Hill, New York, Londres, Paris. **7**: 66-83.

**Mullis, K. B., and Faloona, F.** (1987). Specific synthesis of DNA in Vitro via a polymerase-catalyzed Chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**: 335-350

**Murray, W. D., Duff, S. J. and Beveridge, T. J.** (1990). Catabolite Inactivation in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *App Env Microbiol.*; **56** (8): 2378-83.

**O'Callaghan, J., O'Brien, M. M., McClean, K and Dobson, A. D. W.** (2002) Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **29**(2):55-9.

**Ogata, K., Nishikawa, H. and Ohsugi, M. A.** (1969). Yeast Capable of Utilizing Methanol. *Agricul Biol Chem.*; **33**: 1319.

**Ohi H, Miura M, Hiramatsu R, and Ohmura T.** (1994) The positive and negative *cis*-acting elements for methanol regulation in the *Pichia pastoris AOX2* gene. *Mol. Gen. Genet.* **243**:489–499.

**Olive-Jean Burrowes, Gill Diamond, and Tung-Ching Lee** (2005) Recombinant Expression of Pleurocidin cDNA Using the *Pichia pastoris* Expression System. *J Biomed Biotechnol.* **4**: 374–384

**Otterbein, L, Record, E., Longhi, S., Asther M. and Moukha S.** (2000). Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* 1-937 and expression in *Pichia pastoris*. *Euo. J Biochemic.* **267**: 1619-1625.

**Ozimek, P., Van Dijk, R., Latchev, K., Gancedo, C., Wang, D., Van der Klei, I. and Veenhuis, M.** (2003). Pyruvate Carboxylase Is an Essential Protein in the Assembly of Yeast Peroxisomal Oligomeric Alcohol Oxidase. *Mol Biol Cell.*; **14**: 786-97.

**Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. and Sannia, G.** (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 920-924.

**Papakonstantinou, T., Harris Simon, Hearn, Milton T. W.** (2009) Expression of GFP using *Pichia pastoris* vectors with zeocin or G-418 sulphate as the primary selectable marker. *Yeast* **26**:311-21.

**Payne, M., Petrillo, K., Gavagan, J., Wagner, W. and Di Cosimo, R. Anton, D.** (1995). High-level production of spinach glycolate oxidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: *Engineering Biocatalysis Gene.***167**:215-219.

**Paifer, E., Margolles, E., Cremata, J., Montesino, R., Herrera, L and Delgado, J.** (1994). Efficient expression and secretion of recombinant alfa amylasa in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast.* **10**: 1415-1459.

**Peng Wu, Wenqing Shui, Brian L. Carlson, Nancy Hu, David Rabuka, Julia Lee and Carolyn R. Bertozzi** (2008). Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using the genetically encoded aldehyde tag. *Edited by Arnold L. Demain, Drew University, Madison, NJ*.

**Pichia Protocols (Methods in Molecular Biology) by David R. Higgins**  
Publisher: Humana Press | June 15, 1998 | ISBN: 0896034216 | Pages: 270 | PDF | 15 MB

**Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt R** (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloropsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3805–3809.

**Pingzuo Li, Anukanth Anumanthan, Xiu-Gong Gao, Kuppusamy Ilangovan, Vincent V. Suzara, Nejat Düzgüneş and V. Renugopalakrishnan.** (2007) Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* **142**: 150-124

**Rafael Trindade Burtet, Marcos Antônio Santos-Silva, Guilherme Antônio Marques Buss, Lidia Maria Pepe Moraes, Andrea Queiroz Maranhão and Marcelo Macedo Brigido** (2007) Production of a recombinant Fab in *Pichia pastoris* from a monocistronic expression vector. *Journal of Biochemistry* **142**(6):665-9

**Raimbault, M.** (1980). Fermentation en Milieu Solide. Croissance des Champignons Filamenteux sur Sustrat Amilacé. Tesis doctoral, U. Paul Sabatier, Francia.

**Raimondi, S., Zanni E., Talora, C., Rossi M., Palleschi, C and. Uccelletti, D.** (2008) SOD1, a New *Kluyveromyces lactis* Helper Gene for Heterologous Protein Secretion. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 7130-7137

**Rasa Petraitytė, Li Jin, Rashpal Hunjan, Aušra Ražanskienė, Aurelija Žvirblienė, and Kęstutis Sasnauskas** (2007) Use of *Saccharomyces cerevisiae*-

Expressed Recombinant Nucleocapsid Protein To Detect Hantaan Virus-Specific Immunoglobulin G (IgG) and IgM in Oral Fluid. *Clin Vaccine Immunol.* **14**(12): 1603–1608.

**Ratledge, C.** (2001). Biochemistry and Physiology of Growth and Metabolism, in Basic Biotechnology, C Ratledge, B Kristiansen, Editors., Cambridge University Press:Cambridge. 17- 45p.

**Raúl A., Poutou, Balkys E., Quevedo, Henry A., Homero Sáenz Biol, Luis A. Barrera.** (2005) Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas *AOX1*-reguladas en *Pichia pastoris*. Publicación científica issn. **3**:1794-2470

**Ren, H. T., Yuan, J. Q. and Bellgardt, K. H.** (2003). Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. *J Biotechnol.*; **106**: 53-68.

**Reid, I. D., and Paic E. G. M.** (1994). Biological bleaching of Kraft pulp by white rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiol.Rev.* **13**: 369-376.

**Ridder, R., Schmitz, R., Legay, F. and Gram, H.** (1995). Generation of rabbit monoclonal antibody fragments: from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology.* **13**: 255-260.

**Rodríguez-Jiménez, E., Sánchez, K., Roca, H. and Delgado, J. M.** (1997). Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase. *Biotechnol. Tech.* **11**: 461-466.

**Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., and Hatakka A.** (1991). Influence of aromatic compounds and iiginin on production of iiginolytic enzymes by *Plhebia radiata*. *Phytochemistry* **30**, 2869- 2872.

**Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M.** (1986). Amino acid sequence common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* **234**: 364369.

**Romanos, M. A., Clare, J. J., Beesley, K. M., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Makoff, A. J., Dougan, G, Fairweather, N. F. and Charles, L. G.** (1991). Recombinant *Bordetella pertusis* pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine*. **9**: 901-906.

**Romanos, M. A., Scorer, C. A. and Clare, J. J.** (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*. **8**: 423-488.

**Romanos, M. A.** (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression. *Curr Opinion Biotech*. **6**: 527-533.

**Romanos Mike, Scorer Carol, Sreekrishna Koti and Clar Jeffe** (2008) The Generation of Multicopy Recombinant Strains Book *Pichia* protocols. **103**: 55-72.

**Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N.** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. **230**:1350-1354.

**Salas SD, Bennett, JE Kwon-Chung, KJ Perfect JR and Williamson PR** (1996) Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans* *Journal of Experimental Medicine*, **184**:377-386

**Saloheimo, M., and Niku-Paavola, M. L.** (1991). Heterologous production of a lignolytic enzyme: Expression of the *Phebia radiara* laccase gene in *Trichoderma reesei*. *Biotechnol*. **9**: 987-990

**Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory

**Sánchez-Amat A., Lucas-Elio P., Fernández E., García-Borrón J. C. and Solano F.** (2001). Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim. Biophys.*



*Acta* **1547**:104–116.

**Sanger, F., Nicklen, S and Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec;**74** (12):5463-7

**Scorer, C. A., Clare, J. L., Macombie, R., Romanos, M. A. and Sreekrishna, K.** (1994). Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology*.**12**: 181-184.

**Scorer, C. A., Buckholz, R. G, Clare, J. J. and Romanos, M. A.** (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. **136**: 111-119.

**Siegel, R. S., Buckholz, R. G., Thill, G.P. and Wondrack, L. M.** (1990). Production of epidermal growth factor in methylotrophic yeast cells. *International Patent. Application, publication No. WO 9011 0697*.

**Smith M., Shnyreva A., Wood D.A. and Thurston C.F.** (1998). Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* and *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology* **144**: 1063–1069.

**Soden, D. M. and Dobson, A. D. W.**(2002).Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* **147**: 1755-1763.

**Solomon E. I., Sundaraman U. M. and Machonkin T. E.** (1996). Multiheterocopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**: 2563–2605.

**Spencer J. F., Spencer, A. L., and Laluece, C.** (2002). Non-conventional yeasts. *App Microbiol Biotechnol.*; **58**: 147-56.

**Sreekrishna, K.** (1993). Strategies for optimizing protein expression and secretion in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics. American Society for Microbiology.* **23**: 617-625.

**Sreekrishna, K. and Kropp, K. E.** (1996). *Pichia pastoris* In: Non conventional yeast in *Biotechnology*, Ed. K. Wolf, p. 203-253. Springer.

**Sreekrishna, K., Nelles, L, Potenz, R., Cruze, I, Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P. and Parker, K.** (1989). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor I synthesized in the thylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*. **28**: 4117-4125.

**Sreekrishna, K., Prevatt, W. D., Thill, G. P., Davis, G. R., Koutz, P., Barr, K. A. and Hopkings, S.A.** (1993). Production of *Bacillus* entomotoxins in methylotrophic yeast. *European Patent Application*, Publ. No. EP0586 892 A1.

**Sreekrishna, K., Brankamp, R. G, Kroop, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J. T., Smith, P. L, Wierschke, I. D., Subramaniam, A. and Birkenberger, L. A.** (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**: 55-62.

**Straton, J., Chiruvolu, V. and Meagher, M.** (1998). High cell density fermentation. In: Higgins D.R., Cregg. J.M. *Pichia* Protocols. *Methods Mol Biology*. **103**: 107-120.

**Subramani, S.** (1993). Protein Import Into Peroxisomes and Biogenesis of the Oganelle. *Ann Rev Cell Biol*. **9**: 445-78.

**Suresh - Kumar, S. V., Phale Prashant, S., Durani, S, and Pramod P Wangikar** (2003) Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol Bioeng*. Aug ;**83** (4):386-94

**Sutherland, F. C., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Pior, B. A. and Kilian, S. G.** (1997) Characteristic of Fps-1 dependent and independent glycerol transport in *Sacharamyces cerevisiae*. *J. Bacteriol* **179**: 7790-7795

**Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K., and Inamori, Y.** (2003). A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**:2167–2175

**Swartz, J. R. and Cooney, C.L.** (1981). Methanol inhibition in continuous cultures of *Hansenula polymorpha*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 1206-1213.

**Tamas, M. J., Luyten, K., Sutherland, F. C., Hernández, A., Albertyn, J., Valadi H., Li, H., Prior, B. A., Kilian, S. G., Ramos, J., Guftansson, L., Thevelein, J. M. y Hohmann, S.** (1999). Fsp 1 p controls the accumulations and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol.* **31**:1087-1104.

**Taylor, A. B., Stoj, C. S., Ziegler, L., Kosman, D. J. & Hart, P. J.** (2005). The copper-iron connection in biology: structure of the metallo-oxidase Fet3p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 15459–15464.

**Téllez-Jurado, A., Arana-Cuenca, A., González Becerra, A. E., Viniegra-González, G. and Loera, O.** (2006). Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations. *Enzyme Microb Tech* **38** (5):665-669.

**Tlecuitl-Beristain S., Viniegra-González G., Díaz-Godínez G and Loera O.** (2009) Medium Selection and effect of Higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepitodium* conidial production and quality. *Mycopathologia*. (Published on line).

**a Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A. and Gingeras, T. R.** (1987). Expression of the lac Z gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* **5**(9): 38597.

**b Tschopp, J. F., Severlow, G, Kosson, R., Craig, W. and Grirma, L.** (1987). High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia*

*pastoris*. *Biotechnology*. **5**: 1305-1308.

**Thill, G. P., Davis, G. R., Stillman, C., Holtz, G., Brierley, R., Engel, M., Buckholz, R., Kirmey, L., Provow, S., Vedvick, T. and Siegel, R. S.** (1990). Positive and negative effects of multi-copy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*, p. 477–490. In: *Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Microorganisms*, Vol. II Ed. Heslot, H., Davies, I, Florent, I, Bobichon, L., Durand, G, Penasse, L.; Paris: *Societe Francaise de Microbiologie*. pp. 477-490.

**Thurston, C.F.** (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.* **140**: 19-26

**Tolner Berend, Smith Lisa, Richard H. J. Begent and Kerry A Chester.** (2006). Production of recombinant protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *Nature Protocols* **1**: 1006-1021.

**Van der Klei I. J., Veenhuis M., Nicolay K. and Harder W.** (1989). In vivo Inactivation of Peroxisomal Alcohol Oxidase in *Hansenula polymorpha* by KCN is a Irreversible Process. *Arch Microbiol.*; **151**: 26-33.

**Van der Klei I., Sulter. G., Harder, W. and Veenhuis, M.** (1994). Assembly of Alcohol Oxidase in the Cytosol of a Peroxisome-Deficient Mutant of *Hansenula polymorpha*-Properties of the Protein and Architecture of the Crystals. *Yeast.*; **7**: 195-209.

**Van-Nostrand, W., Schmaier, A., Neiditch, B., Siegel, R., Raschke, W., Sisodia, S. and Wagner, S.** (1994). Expression, purification, and characterisation of the Kunitz type proteinase inhibitory domain of amyloid-protein precursor like protein-2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1209**: 165-170.

**Vedvick, T.S.** (1991). Gene Expression in Yeast: *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotech.*; **2**: 742-45.

**Vedvick, T., Buckholz, R., Engel, M., Urcan, M., Kirmey, J., Provow, S.,**

**Siegel, R. S. and Thill, G. P.** (1991). High-level secretion of biologically active aprotinin from the yeast *Pichia pastoris*. *J Ind I Microbiol Biot.* 7: 197-202.

**Veenhuis, M., Zwart, K. and Harder W.** (1978). Degradation of Peroxisomes After Transfer of Methanol-Grown *Hansenula polymorpha* Into Glucose-Containing Media. *FEMS Microbiol Let.*; 3: 21-28.

**Veenhuis, M., Van Dijken, J. P. and Harder, W.** (1983a). The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* 24: 1-8.

**Veenhuis, M., Douma, A., Harder, W. and Osumi, M.** (1983b). Degradation and Turnover of Peroxisomes in the Yeast *Hansenula polymorpha* Induced by Selective Inactivation of Peroxisomal Enzymes. *Arch Microbiol.*; 134: 193-203.

**Viniegra-González G.** (1997). Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, limitations and monitoring. In Roussos, S.; Lonsane B. K.; Raimbault M. and Viniegra-González, G. Eds. *Advances in Solid State Fermentation*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Chapter 2: 5-22.

**Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar C. N., Romero-Gómez, S. J., Díaz-Godínez, G. and Augur, C.** (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J* 13:157-167.

**Viniegra-González G, and Favela-Torres E.** (2006) Why Solid-State Fermentation Seems to be Resistant to Catabolite Repression?. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (3) 397–406

**Voza, L. A., Wittwer, L., Higgins, D. R., Purcell, T. J., Bergseid, M., Collins-Racie, L. A., LaVallie, E. R. and Hoeffler, J. P.** (1996). Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* Jan;14(1):77-81

**Walsh, G. and Headon, D. R.** (1995). Protein Biotechnology. Ed. John Wiley

and Sons; pp: 1, 13- 15.

**Wahleithmer, J. A., Xu, F., Brown, K., Brown, S., Golightly, E., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A. and Schneider, P.** (1995). The identification and characterization of four laccase genes from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* **29**, 395-403.

**Waterham H, Russell K, De Vries and, Cregg J. M.** (1997). Peroxisomal Targeting, Import, and Assembly of Alcohol Oxidase in *Pichia pastoris*. *The J Cell Biol.*; **139** (6): 1419-31.

**Wei Wang and Xianghua Wen** (2009) Expression of lignin peroxidase H2 from *Phanerochaete chrysosporium* by multi-copy recombinant *Pichia* strain. *Journal of Environmental Sciences* **21**: 218-222.

**Weib, M., Haase, W., Michel, H. and Reilander, H.** (1995). Expression of functional mouse 5-HT5A serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. *FEBS Letters*. **377**: 451-456.

**Wegner, G** (1990). Emerging applications of methylotrophic yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 279-284.

**White, C., Hunter, M., Meininger, D., White, L. and Komives, E.** (1995). Large-scale expression, purification and characterization of small fragments of hombomodulin: the roles of the sixth domain and of methionine 388. *Protejo Eng.* **11**: 1177-1187.

**Willianson, P. R.** (1994). Biochemical and characterization of the diphenol oxidase of *Criptomoccus neoformans*: identification as laccase. *J Bacteriol.* **176**: 656-664.

**Wolfgang Schumann** (2006) Production of Recombinant Proteins in *Bacillus subtilis*. *Advances in Applied Microbiology*, **62**:137-189.

**Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S. and Varfolomeyev, S.D.** (1994) Laccase: properties, catalytic mechanism and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **49**, 257-280.

**Yaver, D. S. and Golightly, E. J.** (1996). Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. *Gene* **181**: 95-102.

**Yaver, D. S., Xu, F., Golightly, E. J., Brown, S. H., Rey, M. W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K. and Dalboge, H.** (1996). Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccases from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 834-841.

**Yaver, D.S., Overjero, M.D., Xu. F., Nelson, B.A., Brown, K.M., Halkier, T., Bernauer, S., Brown, S.H., and Kauppinen, S.** (1999). Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase *Lcc1*. *Appl Environ Microbiol* **65**:4943-4948

**Zhu, A., Monahan, C., Zhang, Z., Hurts, R., Leng, L. and Goldstein, J.** (1995). High-level expression and purification of coffee bean alfa-galactosidasa produced in the yeast *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys.* **324**(11): 65-70.