

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIO MOLECULAR Y CELULAR BAJO LA  
INFLUENCIA DE CONDICIONES DE CULTIVO  
DURANTE LA PRODUCCION DE PROTEINAS  
HETEROLOGAS EN *Pichia pastoris*

Por  
FLOR ESTHELA DIAZ RIVERA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética

MARZO DEL 2001

TM

QP624

.75

.P74

D5

c.1



1080092879

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO MOLECULAR Y CELULAR BAJO LA INFLUENCIA DE  
CONDICIONES DE CULTIVO DURANTE LA PRODUCCION DE PROTEINAS  
HETEROLOGAS EN *Pichia pastoris***

Por

**FLOR ESTHÉLA DÍAZ RIVERA**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**MAESTRIA EN CIENCIAS** con Especialidad en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Marzo, 2001

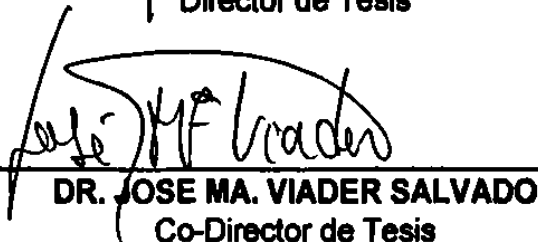
TM  
996241  
75  
P74  
DS  
C+




**ESTUDIO MOLECULAR Y CELULAR BAJO LA INFLUENCIA DE CONDICIONES DE CULTIVO DURANTE LA PRODUCCION DE PROTEINAS HETEROLOGAS EN *Pichia pastoris***

**Aprobación de la Tesis:**

  
DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARAN  
Director de Tesis

  
DR. JOSE MA. VIADER SALVADO  
Co-Director de Tesis

  
DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA  
Co-Director de Tesis

  
DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ  
Comisión de Tesis

  
DRA. KATIUSKA AREVALO NIÑO  
Comisión de Tesis

  
DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Martha Guerrero Olazarán asesor de mi tesis, así como al Dr. José Ma. Viader Salvadó y al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra mis coasesores de tesis por la orientación y consejos que me brindaron para la realización de mi tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

A la Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L por el apoyo brindado para la realización de mis estudios.

A los miembros de mi Comisión de Tesis por el tiempo dedicado en la revisión del escrito y por sus consejos para mejorar el mismo.

Gracias al personal de los siguientes Departamentos de la Facultad de Medicina por permitirme el uso de su equipo y por su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio:

Bioquímica

Microbiología

Histología. Especialmente a Rosy por su asesoría durante el procesamiento de levaduras para Microscopía Electrónica.

Genética Clínica

Al personal del laboratorio del programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. por permitirme el uso de su equipo y por su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A mi generación: Maribel, Sandra, Lolita, Mario, Víctor, Fermín y especialmente a Eddy por sus consejos en el desarrollo de este trabajo.

A todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

*Todo lo puedo en Aquel que me fortalece (Fil 4,13)*

## **DEDICATORIA**

**A Dios porque Él es la luz que ilumina mi vida.**

**Con amor, a mi esposo Leonardo y a mis hijos: Flor Andrea y Jesús Leonardo por el amor que me brindan y por el tiempo que les quité durante la realización de la Maestría y porque son el mejor regalo que Dios me ha dado.**

**Con cariño, a mis padres José Guadalupe y María Dolores por su amor y por su ayuda.**

**Con cariño, a mi familia política, especialmente a mis suegros Elvira y Jesús por su invaluable ayuda.**

**A mis hermanos Lupita, Lety, Jubel y Ramiro y a sus respectivas parejas Rodolfo, Víctor, Elena y Raquel, a mis hermanos solteros Carlos y Anilú.**

**A mi abuelita Elvira y a mis tías María de Jesús y Flor.**

**A mis sobrinos: Rodolfito, Brenda, Lupita; Griselda, Melissa, Enrique; Beto, Daniel, Nenita, Addie y Ramirito.**

***Creo en Dios, como un ciego cree en el sol, no porque lo ve sino porque lo siente.***



## **AREA DE TRABAJO**

**El presente trabajo de investigación se realizó en laboratorios de los Departamentos de Bioquímica, Microbiología e Histología de la Facultad de Medicina y en los laboratorios del programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Asesoría de la Dra. Martha Guerrero de Viader y la Co-asesoría del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y del Dr. José María Viader Salvadó.**

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>1 INTRODUCCION . . . . .</b>	<b>1</b>
1.1 Levaduras . . . . .	1
1.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	2
1.1.2 Levaduras metilotróficas . . . . .	3
1.2 Peroxisomas . . . . .	3
1.2.1 Metabolismo del metanol . . . . .	5
1.2.1.1 Alcohol oxidasa . . . . .	6
1.2.1.2 Catalasa . . . . .	6
1.3 <i>Pichia pastoris</i> . . . . .	7
1.3.1 Sistema de expresión de <i>P. pastoris</i> . . . . .	8
1.3.2 Producción de proteínas recombinantes . . . . .	9
1.3.3 Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i> . . . . .	12
1.3.4 Condiciones de cultivo empleadas para <i>P. pastoris</i> . . . . .	14
1.4 Justificación . . . . .	15
1.5 Objetivo general . . . . .	16
1.5.1 Objetivos específicos . . . . .	16
1.6 Modelo experimental . . . . .	16
 <b>2 MATERIAL Y METODOS . . . . .</b>	 <b>18</b>
2.1 Area de trabajo, reactivos y material biológico	18
2.2 Equipo . . . . .	18
2.3 Estrategia general experimental . . . . .	19
2.4 Métodos . . . . .	21
2.4.1 Selección de las condiciones y composición de los medios de cultivo . . . . .	21
2.4.2 Estandarización de los métodos empleados . . . . .	21
2.4.2.1 Actividad enzimática de $\beta$ -galactosidasa	22
2.4.2.2 Actividad enzimática de AOX . . . . .	23
2.4.2.3 Actividad enzimática de catalasa . . . . .	24
2.4.2.4 Determinación de proteínas totales . . . . .	25
2.4.2.5 Lisis celular . . . . .	26
2.4.2.6 Proliferación peroxisomal . . . . .	27
2.4.3 Fermentación . . . . .	28

2.4.3.1 Fase del crecimiento celular . . . . .	29
2.4.3.2 Fase de inducción . . . . .	29
2.4.4 Evaluación y comparación de procesos bioquímicos y celulares . . . . .	30
2.4.4.1 Evaluación y comparación del crecimiento celular . . . . .	32
2.4.4.1.1 Cinética de crecimiento evaluada por D.O. <sub>600</sub> . . . . .	32
2.4.4.1.2 Cinética de crecimiento evaluada por peso húmedo . . . . .	32
2.4.4.2 Lisis celular . . . . .	34
2.4.4.3 Evaluación y comparación de la actividad enzimática de β-galactosidasa . . . . .	34
2.4.4.4 Evaluación y comparación de la actividad enzimática de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa . . . . .	36
2.4.4.5 Comparación de la concentración de proteína intracelular soluble . . . . .	37
2.4.4.6 Comparación de la proliferación peroxisomal . . . . .	37
2.4.5 Correlación de los cambios bioquímicos y celulares con la producción de β-galactosidasa . . . . .	38
<b>3 RESULTADOS . . . . .</b>	<b>39</b>
3.1 Selección de las condiciones y composición de los medios de cultivo . . . . .	39
3.2 Estandarización de los métodos empleados para la evaluación de procesos bioquímicos y celulares . . . . .	40
3.2.1 Actividad enzimática de β-galactosidasa . . . . .	40
3.2.2 Actividad enzimática de AOX . . . . .	42
3.2.3 Actividad enzimática de catalasa . . . . .	42
3.2.4 Determinación de proteínas totales . . . . .	42
3.2.5 Lisis celular . . . . .	45
3.2.6 Proliferación peroxisomal . . . . .	46
3.3 Fermentación de la cepa GS115 β-galactosidasa de <i>P. pastoris</i> . . . . .	47
3.4 Evaluación y comparación de procesos bioquímicos y celulares . . . . .	48
3.4.1 Evaluación y comparación del crecimiento celular . . . . .	48
3.4.1.1 Cinética de crecimiento evaluada por D.O. <sub>600</sub> . . . . .	48
3.4.1.2 Cinética de crecimiento evaluada por peso húmedo . . . . .	50
3.4.2 Evaluación y comparación de la actividad enzimática de β-galactosidasa . . . . .	51

3.4.3 Evaluación y comparación de la actividad enzimática de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa . . . . .	54
3.4.3.1 Alcohol oxidasa . . . . .	54
3.4.3.2 Catalasa . . . . .	58
3.4.4 Comparación de las proteínas intracelulares solubles . . . . .	60
3.4.5 Evaluación y comparación de la proliferación peroxisomal . . . . .	61
3.5 Correlación de los cambios bioquímicos y celulares con la producción de $\beta$ -galactosidasa.	65
<b>4 DISCUSION . . . . .</b>	<b>67</b>
<b>5 CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>73</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA . . . . .</b>	<b>75</b>
<b>7 REACTIVOS . . . . .</b>	<b>80</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Ejemplos de proteínas heterólogas producidas en <i>P. pastoris</i> . . . . .	10
II. Condiciones de cultivo utilizadas en fermentaciones con <i>P. pastoris</i> . . . . .	15
III. Curva de calibración de ASB. . . . .	25
IV. Condiciones de cultivo seleccionadas para fermentaciones a nivel matraz con <i>P. pastoris</i> . . . . .	39
V. Composición de los medios de cultivo seleccionados para el desarrollo experimental de este trabajo de investigación. . . . .	41
VI. Repetibilidad y reproducibilidad obtenidas en la estandarización de los diferentes métodos empleados en este estudio. . . . .	43
VII. Ensayos de fermentación realizados en este estudio. . . . .	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación esquemática del metabolismo del metanol en <i>P. pastoris</i> . . . . .	7
2. Estrategia general experimental. . . . .	20
3. Representación esquemática del ensayo de fermentación llevado a cabo en este estudio. . . . .	30
4. Estrategia seguida para la toma de muestras para evaluar los procesos bioquímicos y celulares. . . . .	31
5. Pasos efectuados para la comparación del crecimiento celular de la levadura entre todos los medios de cultivo seleccionados a los tiempos de inducción establecidos. . . . .	33
6. Representación esquemática de la estrategia experimental para evaluar las actividades enzimáticas de las enzimas peroxisomales y de la proteína recombinante. . . . .	35
7. Estrategia seguida para evaluar y comparar las actividades enzimáticas de las enzimas peroxisomales y de la proteína recombinante. . . . .	36
8. Cambio de la absorbancia a lo largo del tiempo obtenida durante la estandarización de la determinación de la actividad enzimática de AOX y catalasa. . . . .	44
9. Recta de calibración para la determinación de proteínas totales. . . . .	44

10. Actividad de catalasa en los lavados de las perlas de vidrio durante la estandarización del método de lisis celular. . . . .	45
11. Método de lisis celular que se realizó en este trabajo de investigación. . . . .	46
12. Micrografías electrónicas de <i>P. pastoris</i> GS115 $\beta$ -galactosidasa cultivada en glicerol A) y metanol B) como fuente de carbono y energía durante 48 h. . . . .	47
13. Representación en gráfico semilogarítmico del crecimiento celular determinado por D.O. <sub>600</sub> de <i>P. pastoris</i> GS115 $\beta$ -galactosidasa, en los cuatro medios de cultivo estudiados bajo condiciones de inducción. . . . .	49
14. Velocidad específica de crecimiento A) y tiempo de generación B) de <i>P. pastoris</i> GS115 $\beta$ -galactosidasa a las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo. . . . .	50
15. Peso húmedo de <i>P. pastoris</i> GS115 $\beta$ -galactosidasa en los medios de cultivo evaluados bajo condiciones de inducción. . . . .	51
16. Concentración de $\beta$ -galactosidasa por litro de cultivo durante la fase de inducción en los cuatro medios de cultivo estudiados. . . . .	52
17. Actividad específica de $\beta$ -galactosidasa en <i>P. pastoris</i> GS115 $\beta$ -galactosidasa en los medios de cultivo evaluados bajo condiciones de inducción. . . . .	53
18. Velocidad aparente de síntesis de $\beta$ -galactosidasa bajo condiciones de inducción. . . . .	54
19. Actividad enzimática de AOX en el medio de cultivo durante el proceso de inducción en los cuatro medios de cultivo estudiados. . . . .	55
20. Actividad específica de AOX en <i>P. pastoris</i> GS115 $\beta$ -galactosidasa en los medios de cultivo evaluados bajo condiciones de inducción. . . . .	56

21. Velocidad aparente de síntesis de AOX en los cuatro medios de cultivo bajo condiciones de inducción. . . . .	57
22. Actividad enzimática de catalasa en el medio de cultivo durante el proceso de inducción en los cuatro medios de cultivo estudiados. . . . .	58
23. Actividad específica de catalasa en <i>P. pastoris</i> GS115 $\beta$ -galactosidasa en los medios de cultivo evaluados bajo condiciones de inducción. . . . .	59
24. Velocidad aparente de síntesis de catalasa en los cuatro medios de cultivo bajo condiciones de inducción. . . . .	60
25. Concentración de proteína intracelular en el medio de cultivo en los medios de cultivo estudiados bajo condiciones de inducción. . . . .	61
26. Micrografías electrónicas de <i>P. pastoris</i> GS115 $\beta$ -galactosidasa crecida en medio mínimo con metanol como fuente de carbono. . . . .	63
27. Micrografías electrónicas de <i>P. pastoris</i> GS115 $\beta$ -galactosidasa cultivada en medio con sales con metanol como fuente de carbono. . . . .	64
28. Coeficientes de correlación lineal de la actividad específica de $\beta$ -galactosidasa con la actividad específica de las enzimas peroxisomales. . . . .	65
29. Coeficientes de correlación lineal de la actividad enzimática de $\beta$ -galactosidasa en el cultivo con las actividades enzimáticas de AOX y catalasa, con el crecimiento celular y con la concentración proteínas intracelulares solubles . . . . .	66



## NOMENCLATURA

$\Delta$ Abs	Cambio de absorbancia
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ L	Microlitros
AA	Aminoácido(s)
Abs	Absorbancia
ABTS	2,2-Azino-bis(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonato)
ác.	Acido
ADN	Acido Desoxirribonucleico
AOX	Enzima alcohol oxidasa
<i>AOX1</i>	Gen de la alcohol oxidasa 1
<i>AOX2</i>	Gen de la alcohol oxidasa 2
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ASB	Albúmina Sérica Bovina
ASH	Albúmina Sérica Humana
C.V.	Coefficiente de variación
C.V. <sub>EEM</sub>	Coefficiente de variación del error estándar de la media
D.O. <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
FAD	Dinucleótido de Flavina y Adenina
FD	Factor de dilución
FNT	Factor de necrosis tumoral
g	Gramos
Glu	Ac. Glutámico

<b>h</b>	<b>Hora(s)</b>
<b>HBsAg</b>	<b>Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B</b>
<b>HGH</b>	<b>Hormona del crecimiento humano</b>
<b>HIV</b>	<b>Virus de la inmunodeficiencia humano</b>
<b>Ig</b>	<b>Inmunoglobulina</b>
<b>Ile</b>	<b>Isoleucina</b>
<b>kb</b>	<b>Kilobases</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilodaltones</b>
<b>L</b>	<b>Litros</b>
<b>Leu</b>	<b>Leucina</b>
<b>Lis</b>	<b>Lisina</b>
<b>M</b>	<b>Molar</b>
<b>Met</b>	<b>Metionina</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramos</b>
<b>min</b>	<b>Minuto(s)</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>
<b>mM</b>	<b>Milimolar</b>
<b>MM</b>	<b>Medio mínimo</b>
<b>MMAG</b>	<b>Medio mínimo suplementado con ác. graso</b>
<b>MMAV</b>	<b>Medio mínimo suplementado con aminoácidos y vitaminas</b>
<b>MMG</b>	<b>Medio mínimo con glicerol</b>
<b>MMGAG</b>	<b>Medio mínimo con glicerol suplementado con ác. graso</b>
<b>MMGAV</b>	<b>Medio mínimo con glicerol suplementado con aminoácidos y vitaminas</b>
<b>MMM</b>	<b>Medio mínimo con metanol</b>
<b>MMMAG</b>	<b>Medio mínimo con metanol suplementado con ác. graso</b>
<b>MMMAV</b>	<b>Medio mínimo con metanol suplementado con aminoácidos y vitaminas</b>
<b>MS</b>	<b>Medio con sales</b>
<b>MSG</b>	<b>Medio con sales y glicerol</b>
<b>MSM</b>	<b>Medio con sales y metanol</b>

Mut <sup>-</sup>	Mutante que no posee el gen <i>AOX1</i>
Mut <sup>+</sup>	Mutante que posee el gen <i>AOX1</i>
n	Número de datos
nm	Nanómetros
°C	Grados Celsius
ONPG	O-nitrofenil-β-D-galactosido
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
P.H.	Peso húmedo
P.T.	Proteínas totales
pb	Pares de bases
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones H <sup>+</sup>
PM	Peso molecular
r	Coefficiente de correlación lineal de Pearson
r <sup>2</sup>	Coefficiente de correlación lineal
rpm	Revoluciones por minuto
s	Desviación estándar
s	Segundo
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
t	Tiempo
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V <sub>AS</sub>	Velocidad aparente de síntesis
Vit	Vitamina(s)
$\bar{x}$	Promedio
X	Aumentos
YNB	Nitrógeno base de levadura
YPD	Medio de cultivo Extracto de levadura, Peptona y Dextrosa

## RESUMEN

Flor Esthela Díaz Rivera

Fecha de Graduación: Marzo, 2001

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

**Título del Estudio:** Estudio molecular y celular bajo la influencia de condiciones de cultivo durante la producción de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*

Número de páginas: 84

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Area de Estudio: Biotecnología

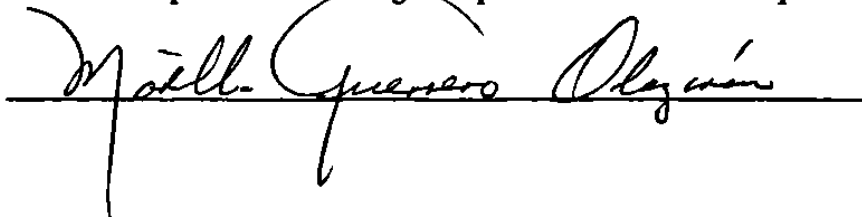
**Propósito y Método del Estudio:** Las levaduras metilotróficas son capaces de utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía, el crecimiento de estas levaduras en metanol está asociado con la síntesis de cantidades considerables de las enzimas peroxisomales alcohol oxidasa (AOX) y catalasa y con el desarrollo de peroxisomas en las células. Hasta ahora se conoce como afectan algunas condiciones ambientales en la proliferación de los peroxisomas y las enzimas involucradas en este proceso; sin embargo se sabe poco acerca de como se ven afectados estos procesos por la presencia de genes heterólogos integrados en el genoma de estas levaduras y sus productos producidos durante la activación de estos mecanismos.

En este trabajo se realizó un estudio con el fin de evaluar la influencia de las condiciones de cultivo sobre los procesos bioquímicos y celulares relacionados con los mecanismos que regulan la producción de proteínas recombinantes empleando a la levadura metilotrófica *P. pastoris* GS115  $\beta$ -galactosidasa como hospedero.

La cepa GS115  $\beta$ -galactosidasa de *P. pastoris* se cultivó a nivel matraz en cuatro medios de cultivo diferentes (MM, MMAV, MMAG y MS), utilizando un cultivo en lote alimentado con metanol cada 24 h durante 72 h. El crecimiento celular, proliferación peroxisomal, actividad y concentración de  $\beta$ -galactosidasa, actividad enzimática de alcohol oxidasa, actividad enzimática de catalasa y concentración de proteínas intracelulares solubles fueron los procesos bioquímicos y celulares evaluados a las 3, 27, 51 y 72 h de haber iniciado la inducción con metanol de cada cultivo. A los tiempos de inducción estudiados se realizó una comparación de la influencia de la composición del medio de cultivo sobre los parámetros evaluados, empleando las pruebas estadísticas de análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Newman. Por último, se determinó la correlación entre los niveles de producción de la proteína recombinante ( $\beta$ -galactosidasa) y los valores determinados para cada proceso bioquímico y celular evaluada con la prueba de correlación lineal de Pearson.

**Contribuciones y conclusiones:** Los valores de los procesos bioquímicos evaluados de los cultivos en medio mínimo (MM) y los medios mínimos suplementados (MMAV, MMAG) no mostraron diferencias significativas entre sí. Sólo se observaron diferencias en los valores de los procesos evaluados en el medio con sales (MS). Estas diferencias fueron dependientes de la fase de crecimiento y pueden ser debidas a una disminución en la biosíntesis de las proteínas celulares causada por un daño inicial al cultivo por la composición de este medio. La disminución en la biosíntesis proteica en los cultivos en el medio MS puede ser la causa de niveles más bajos de proteína recombinante en la fase exponencial de crecimiento comparada con los otros medios de cultivo empleados. Los mayores niveles de producción de  $\beta$ -galactosidasa se obtuvieron en la fase estacionaria en todos los medios de cultivo. Los resultados obtenidos con el modelo experimental estudiado sugieren que manteniendo el cultivo en la fase logarítmica del crecimiento se obtiene mayor tasa de síntesis de la proteína recombinante en estudio. Este estudio ha permitido determinar que con los parámetros empleados para evaluar los diferentes procesos bioquímicos se pueden establecer estrategias fundamentadas en la selección de las condiciones de cultivo para optimar la producción de proteínas heterólogas empleando el sistema de *P. pastoris*.

FIRMA DEL ASESOR:



## **CAPITULO 1**

### **INTRODUCCION**

Desde el descubrimiento de la estructura tridimensional del ADN se han desarrollado numerosas técnicas con las que ha sido posible manipular el ADN y entender los mecanismos de la regulación genética. Gracias a estas técnicas denominadas técnicas del ADN recombinante se han desarrollado sistemas de expresión para la producción de proteínas heterólogas de origen humano, animal, vegetal o viral que en muchos casos son difíciles de obtener de su fuente natural porque no pueden ser aisladas en cantidades suficientes o también porque son proteínas rediseñadas y no son encontradas en la naturaleza (4, 8). Estos sistemas de expresión consisten básicamente de un vector de expresión en el cual se introduce el gen de la proteína de interés y de un hospedero y a la fecha se han utilizado como hospederos bacterias, levaduras, hongos, células en cultivo de mamíferos o de insectos y animales transgénicos (8).

#### **1.1 Levaduras**

El sistema de expresión de levaduras ha sido usado exitosamente por casi dos décadas en investigación básica y en la industria de la biotecnología para la producción y secreción de proteínas heterólogas eucarióticas, debido a que ofrecen diversas ventajas sobre otros sistemas como son: la existencia de técnicas de manipulación molecular y genética bien conocidas, técnicas de fermentación sencillas y de costo bajo, capacidad

de hacer modificaciones postraduccionales complejas, altos rendimientos de proteína intracelular y secreción eficiente de un producto recombinante idéntico o muy similar a la proteína nativa (3, 10, 28). Además existe un amplio rango de especies de levaduras que son empleadas para la producción de proteínas recombinantes, entre las que se incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica* (4)

### 1.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

La primera especie de levadura utilizada para la producción de proteínas recombinantes fue *S. cerevisiae* (28), la cual tiene la ventaja de poder dirigir la proteína recombinante en el camino secretorio mediante la fusión de esta proteína madura con la secuencia del factor alfa, el cual es removido por una acción proteolítica. Sin embargo, *S. cerevisiae* tiene varias limitaciones como sistema de expresión; generalmente las productividades son bajas alcanzando un máximo de 1-5% de la proteína total debido a que los niveles de expresión y la calidad de la proteína heteróloga sintetizada sufre muchas veces limitaciones específicas del organismo como son: carencia de promotores fuertemente regulados, pobre eficiencia de secreción (especialmente de proteínas > 30 kDa), inestabilidad de la cepa productora e incapacidad de lograr altas densidades celulares en fermentadores. Debido a las desventajas de *S. cerevisiae* para la producción de proteínas heterólogas mencionadas anteriormente se empezaron a utilizar las levaduras metilotróficas para este propósito (3, 10, 28).

### 1.1.2 Levaduras metilotróficas

Al inicio de los años 70's, se empezaron a aislar de la naturaleza las levaduras metilotróficas debido al interés en la producción de biomasa a partir de metanol (10, 26, 27) y a la fecha se han identificado cepas pertenecientes solo a cuatro géneros: *Pichia*, *Hansenula*, *Candida* y *Torulopsis* (5, 10, 31).

Estas levaduras se denominan metilotróficas porque son capaces de utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía, debido a que contienen un mecanismo de empleo de metanol finamente regulado (27). Poseen las mismas ventajas que *S. cerevisiae* para la producción de proteínas recombinantes y además proveen un medio confiable para lograr productividades elevadas, ya que poseen elementos promotores regulados en forma precisa y eficiente por lo que algunas cepas específicas han sido estudiadas intensamente para su aplicación comercial tanto en la producción de proteínas recombinantes como en la producción de biomasa y también por su utilidad como sistema modelo para esclarecer los mecanismos involucrados en la biogénesis y función de los peroxisomas ya que el crecimiento de estas levaduras en metanol está asociado con el desarrollo de peroxisomas en las células (10, 27, 32).

## 1.2 Peroxisomas

Los peroxisomas son organelos que están presentes ubicuamente en las células eucarióticas, tienen una arquitectura simple, están rodeados por una sola membrana y pueden existir como estructuras esféricas simples o como redes reticulares complejas (6, 10, 12, 35). Son únicos entre los organelos eucarióticos ya que su forma, tamaño, número y contenido enzimático varía dependiendo del organismo, tipo celular,

necesidades metabólicas de cada organismo y condiciones ambientales que rodean a la célula (35). Los peroxisomas son importantes para el crecimiento celular ya que pueden contener una gran variedad de enzimas que llevan a cabo numerosos procesos bioquímicos como son: degradación de  $H_2O_2$ , degradación de D-aminoácidos y purinas, beta-oxidación de ácidos grasos de cadena larga, síntesis de colesterol, ácidos biliares y plasmalógenos y en las levaduras metilotróficas la oxidación del metanol (12, 35).

Los peroxisomas son importantes en la fisiología humana como es demostrado por varios desórdenes asociados a mal funcionamiento de los peroxisomas (6, 35), por lo que en los últimos años se ha intensificado el estudio de los mecanismos involucrados en la biogénesis y degradación de estos organelos.

Una característica específica de los peroxisomas es que su biogénesis es inducible en la naturaleza. Cuando son inducidos, se forman nuevos peroxisomas por crecimiento y división de organelos preexistentes, aunque la síntesis de novo no ha sido excluida. Sin embargo, los peroxisomas carecen de ADN y de una maquinaria de síntesis de proteínas (12). Todas las proteínas peroxisomales identificadas son codificadas por genes nucleares, sintetizadas en polisomas libres e importadas postraduccionalmente hacia el organelo (6).

En las levaduras metilotróficas se induce la biogénesis de los peroxisomas simplemente con cambiar la composición del medio de cultivo, específicamente cuando este medio contiene fuentes de carbono y nitrógeno específicas que para poder ser metabolizadas requieren la actividad de una oxidasa productora de  $H_2O_2$  como son: el metanol, ácido oleico (solo *P. pastoris*), D-aminoácidos, aminas primarias y purinas. Los organelos son importantes para el crecimiento de estas levaduras bajo estas



condiciones porque ellos contienen las enzimas claves involucradas en el metabolismo primario de los sustratos de crecimiento específicos usados (34).

Un ejemplo de cómo se ve afectada la biogénesis, tamaño y forma de los peroxisomas por la composición del medio y las condiciones de cultivo en las levaduras metilotróficas es el siguiente: cuando las células son crecidas en glucosa, generalmente uno o pocos peroxisomas muy pequeños están presentes asociados a la pared celular, mientras que en metanol se observan peroxisomas numerosos y grandes los cuales pueden ocupar hasta un 80% del volumen celular total (34), estos organelos aparecen en grupos en la célula o existen en asociación cercana con cadenas de retículo endoplásmico. En la fase de crecimiento exponencial, en cultivo en lote, generalmente tienen una forma esférica con una matriz parcialmente cristalina, sin embargo en cultivos en quimiostato limitado con metanol estos organelos son completamente cristalinos y de forma cúbica (32, 34).

### 1.2.1 Metabolismo del metanol

La proliferación peroxisomal observada cuando las levaduras metilotróficas crecen en metanol se debe a que la primera reacción en el metabolismo del metanol, que es la oxidación del metanol a formaldehído, se realiza dentro de estos organelos. En esta reacción se produce peróxido de hidrógeno el cual es tóxico para la célula, llevándose a cabo las subsecuentes reacciones del metabolismo de este sustrato en el citoplasma (ver Figura 1) (5, 32). En conjunto con la proliferación peroxisomal, el crecimiento de las levaduras metilotróficas en metanol está ampliamente relacionado con la síntesis de cantidades considerables de las enzimas peroxisomales alcohol oxidasa (AOX) y

catalasa y de la enzima dihidroxiacetona sintasa, llegando a constituir el 60-80% de la proteína celular total (10, 32).

#### 1.2.1.1 Alcohol oxidasa

La AOX es una proteína de alto peso molecular (PM) (620 kDa) que consiste de 8 subunidades idénticas, unida cada una de forma no covalente a una molécula de dinucleótido de flavina y adenina (FAD), estas unidades monoméricas son sintetizadas en el citosol y ensambladas en los peroxisomas, siendo activa esta enzima solo en la matriz peroxisomal. La AOX cataliza la primera reacción en el metabolismo del metanol reaccionando con el  $O_2$  como aceptor de electrones con la producción de  $H_2O_2$  (ver Figura 1), como la AOX tiene baja afinidad por el  $O_2$ , la célula compensa produciendo grandes cantidades de AOX la cual llega a ocupar hasta un 30-35% de la proteína celular total (3, 27, 31, 32).

#### 1.2.1.2 Catalasa

La catalasa degrada el  $H_2O_2$  producido por la acción de la AOX en agua y oxígeno (ver Figura 1), en su forma activa esta enzima es una hemoproteína tetramérica de ~240 kDa que consiste de cuatro subunidades idénticas de PM ~60 kDa arregladas tetrahédricamente, las cuales se sintetizan en el citosol y se ensamblan en los peroxisomas (1).

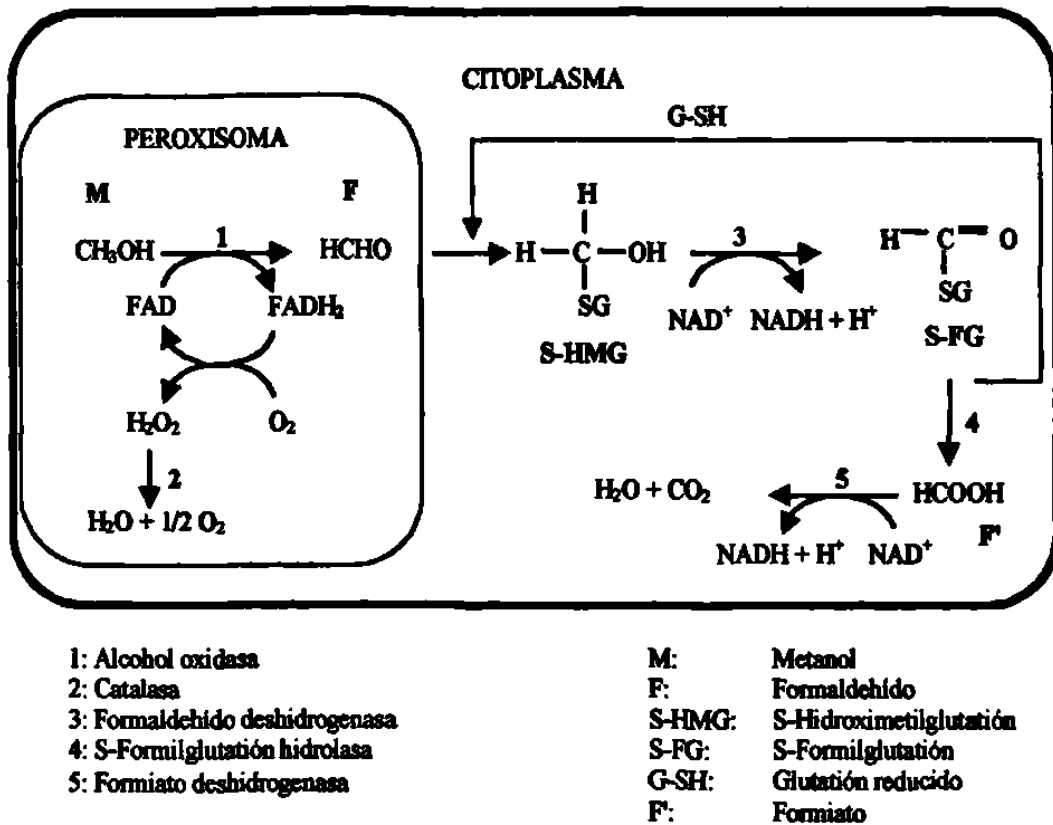


Figura 1. Representación esquemática del metabolismo del metanol en *P. pastoris*.

### 1.3 *Pichia pastoris*

Aprovechando la característica de la síntesis aumentada de las proteínas que participan en el metabolismo del metanol y con la clonación y caracterización de los elementos promotores que controlan la expresión a alto nivel de estas proteínas y la habilidad para manipular genéticamente estas levaduras, ha sido posible que las levaduras metilotróficas sean empleadas como hospederos potencialmente atractivos para la producción de proteínas heterólogas (10).

*P. pastoris* es una levadura metilotrófica que actualmente es una de las más empleadas como hospedero (8), en la producción de proteínas recombinantes. Hay varias razones para este hecho: Sus condiciones de crecimiento son similares a las de *S.*

*cerevisiae*, como levadura metilotrófica contiene el promotor AOX inducible de forma fuerte y precisa y que es usado para la producción de proteínas, es capaz de generar modificaciones postraduccionales que son más similares a la proteína original que aquéllas realizadas por *S. cerevisiae*, y es capaz de realizar altos niveles de expresión reportándose niveles de hasta 12 g/L de producción de proteína recombinante, la purificación de la proteína heteróloga secretada es facilitada porque tiene baja secreción de proteína endógena (21).

En *P. pastoris* se han identificado dos genes (*AOX1* y *AOX2*) que codifican para dos enzimas AOX (10), las regiones codificantes de estos genes tienen una similitud del 92 y 97% en la secuencia nucleotídica y aminoacídica respectivamente, los elementos promotores de estos genes tienen poca similitud y están bajo el control de un mecanismo general de represión/desrepresión y un mecanismo de inducción por una fuente de carbono específica (28). La gran mayoría de los transcritos provienen del gen *AOX1*, el cual tiene un tamaño de 2261 pb (GI = 2174799), la expresión de este gen está regulada de forma precisa por una región promotora de 940 pb ya que cuando esta levadura crece en glucosa o etanol la enzima AOX es indetectable.

### 1.3.1 Sistema de expresión de *P. pastoris*

El metanol induce fuerte y eficientemente al promotor del gen *AOX1*, característica por la cual este promotor es usado para la expresión de genes extraños, por lo que se han construido varios vectores de expresión que tienen las siguientes características en común: tienen una secuencia regulatoria 5' *AOX1* que contiene el promotor del gen *AOX1*, una secuencia de ADN que codifica para una secuencia señal de secreción nativa o heteróloga, una secuencia de 256 pb que corresponde a la señal de

terminación de la transcripción del gen *AOX* nativo, una región 3' *AOXI* adelante de la secuencia de terminación, el gen de la histidinol deshidrogenasa de 2.8 kb empleado como marcador de selección para las cepas *P. pastoris* (*his4*), genes que permiten la propagación en *Escherichia coli* como son el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación ColE1 y sitios únicos de restricción que se utilizan para clonar el gen de interés (3, 8, 13, 26).

Aprovechando la construcción de estos vectores y la existencia de cepas auxotróficas de *P. pastoris* ha sido posible realizar técnicas de integración sitio dirigida por recombinación homóloga en esta levadura para producir cepas genéticamente estables. Estas cepas pueden ser de dos tipos dependiendo de la técnica de integración del cassette de expresión; si es una inserción génica, es decir, si al integrarse no se reemplaza o inactiva el gen *AOXI* se producirá una cepa  $Mut^+$ , la cual tendrá la capacidad de usar el metanol de igual forma que la cepa silvestre; y si es una sustitución génica, es decir, si al integrarse se reemplaza el gen *AOXI* la cepa será  $Mut^-$  y tendrá disminuida la capacidad de utilizar el metanol en comparación con la cepa silvestre (8,10,13).

### 1.3.2 Producción de proteínas recombinantes

El sistema de expresión de *P. pastoris* es utilizado para la producción de una gran cantidad de proteínas con un grado de éxito variable (ver TABLA I) (3, 9). Es decir, existen ejemplos de niveles altos de producción como es el caso del factor de necrosis tumoral (FNT) humano, el cual se ha producido a una concentración de 10 g/L de forma

extracelular, o el caso de la  $\beta$ -galactosidasa, la cual llega a ocupar hasta el 20% de la proteína intracelular soluble.

Tabla I

Ejemplos de proteínas heterólogas producidas en *P. pastoris*

Proteína	Número de copias	Localización	Cantidad (g/l) *
$\beta$ -galactosidasa ( <i>E. coli</i> )	?	I	20% de proteína soluble
HBsAg	1	I	0.300
Lisozima bovina	1	S	0.460
ASH	1	S	4.000
FNT humano	10	I	10.000
HIV gp 120	12	I	1.250
Aprotinina	2	S	0.320
Superóxido bismutasa	1	I	0.330
Receptor Ig E (sub. a)	?	S	0.020
HGH	1	S	0.012 **

I = intracelular, S = secreción.

\* Sacado de Cregg J.M., Vedvick T.S., Raschke W.C. (1993) (27).

\*\* Sacado de Escamilla, L.L., Viader, J.M., Barrera, H.A., Guerrero, M. (2000) (7).

Sin embargo, a pesar de las ventajas de este sistema de expresión también existen ejemplos de niveles bajos de producción o no expresión (21). Debido a esto se ha considerado que los siguientes factores se deben tomar en cuenta para optimar la expresión y producción de una proteína recombinante en *P. pastoris* (24, 25):

- Replicación autónoma o integración cromosómica del casete de expresión Este factor es importante porque se afecta la estabilidad del casete de expresión, en general se prefieren los vectores de integración porque son estables, generan cepas multicopia, se puede controlar el sitio de integración y se puede dirigir el modo de integración (con o sin interrupción del gen *AOXI*). En contraste, los

vectores autónomos son inestables, generan bajo número de copias y se integran en uno o más loci cromosómicos.

- **Dosis génica.** El efecto de la dosis génica no se puede predecir, existen ejemplos en los que una copia del casete de expresión es suficiente para una producción óptima, otros en los que al aumentar el número de copias se aumenta la producción y otros en los que el incremento en el número de copias tiene un efecto negativo en la producción, por lo tanto, es importante examinar el nivel de producción en función de la dosis génica.
- **Tipo de cepa ¿Mut<sup>-</sup> o Mut<sup>+</sup>?** Mut<sup>-</sup> crecimiento lento en metanol, Mut<sup>+</sup> crecimiento normal en metanol. Para expresión intracelular se prefiere Mut<sup>-</sup> y para secreción se utilizan ambas, aunque lo ideal es probar la producción de la proteína recombinante en ambas cepas.
- **Secuencias 5' y 3' del ARNm no traducibles.** Para una producción óptima es preferible que estas secuencias sean idénticas a las del ARNm de *AOX1*.
- **Formación de estructuras secundarias alrededor del codón de iniciación de la traducción.** Para asegurar una traducción eficiente del ARNm, el codón de iniciación debe estar relativamente libre de la estructura secundaria. La estructura secundaria del ARNm puede ser ajustada rediseñando la porción inicial de las secuencias codificantes con codones alternativos.
- **Composición A+T.** Los genes que tienen un alto contenido de nucleótidos A+T no son transcritos eficientemente debido a una terminación prematura de la transcripción. Para evitar esto, es importante rediseñar los genes para que tengan

un contenido de A+T en el rango de 30-50%, usando los codones preferenciales de *P. pastoris*.

- **Señal de secreción.** Para las proteínas que son secretadas normalmente es adecuado utilizar la secuencia señal nativa, si esta secuencia no está disponible se puede utilizar el factor alfa de *S. cerevisiae*.
- **Estabilidad del producto.** Para mejorar la estabilidad proteolítica de las proteínas secretadas se pueden utilizar cepas deficientes en proteasas, también se puede cambiar el pH del medio (el rango de pH recomendado en el que se puede experimentar está entre 2.8 y 6.5) y las condiciones de crecimiento (agregando casaminoácidos o peptona al medio).
- **Condiciones de cultivo** (ver sección 1.3.3)

### 1.3.3 Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*

Entre los factores que afectan la expresión y producción de una proteína recombinante se incluyen las condiciones de cultivo donde es importante considerar los siguientes factores:

**Tipo de cultivo.** El tipo de cultivo se refiere a la forma en que se administran los nutrientes, por ejemplo en un cultivo en lote, los nutrientes se proporcionan solo al inicio de la fermentación; en un cultivo en lote alimentado los nutrientes se adicionan periódicamente, en un cultivo continuo se agregan continuamente como lo indica su nombre, el tipo de cultivo también puede consistir en una combinación de los anteriores.

**Parámetros de fermentación.** Incluye la concentración de oxígeno, temperatura, agitación y pH.



**Composición del medio de cultivo.** En la composición del medio de cultivo, básicamente es importante la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y los micronutrientes que se utilizan.

Es importante optimar las condiciones de cultivo ya que se ha visto que pueden tener una influencia marcada en la producción de proteínas heterólogas:

Solo con cambiar el pH del medio de cultivo se afecta la producción, por ejemplo en el caso de Albúmina Sérica Humana (ASH) se incrementa tres veces la cantidad de proteína secretada a pH 5.8 comparado al utilizado normalmente de 5.0 (25). También en la producción del factor de crecimiento epidérmico humano y del factor de crecimiento semejante a insulina se incrementan los niveles de secreción de 2-4 veces a pH 3.0 o como el caso del dominio V<sub>1</sub> de CD<sub>4</sub> que solo se produce a pH ácido (25).

Además del pH, también la composición del medio de cultivo y la cantidad de oxígeno disuelto mejoran la producción de proteínas específicas, por ejemplo, en la producción de ASH la aireación incrementó hasta 20 veces la cantidad de ASH producida (25, 26) comparado a un cultivo sin aireación, la adición de extracto de levadura y peptona al medio de cultivo incrementó al doble el nivel de secreción de ASH producida (20, 26) y en la producción del activador de plasminógeno tisular la adición de estos nutrientes mejoró marcadamente la producción (25); la adición de casaminoácidos a una concentración del 1% provocó un aumento en la producción del factor de crecimiento epidérmico de ratón y la adición de trazas de algunos metales mejoró la productividad del antígeno de superficie de la hepatitis B (25). También la adición de ácidos grasos, tales como el ácido mirístico, palmítico, palmitoleico, oleico, etc., a un medio de composición constante incrementó la cantidad de proteína producida, llegando a incrementarse hasta el doble con respecto a un control al que no se le agregaron ácidos

grasos, no sólo el agregar el ácido graso afectó la producción sino también la concentración de éste, en este caso la mayor producción de proteína recombinante se obtuvo a una concentración de 0.05% de ácido graso en el medio de cultivo (16).

#### 1.3.4 Condiciones de cultivo empleadas para *P. pastoris*

Las condiciones de cultivo descritas en la literatura para *P. pastoris* que se utilizan generalmente se indican en la TABLA II (16, 25). Las fermentaciones se realizan a nivel matraz o a nivel fermentador. El medio de cultivo más empleado a nivel matraz consiste básicamente de una fuente de carbono y energía que normalmente es glicerol (fase de crecimiento) o metanol (fase de inducción), una fuente de nitrógeno que generalmente es nitrógeno base de levadura (YNB) y de una solución amortiguada, a este medio se le denomina medio mínimo. Este medio también se puede enriquecer con algunos nutrientes y entonces se le designa como medio mínimo suplementado, también se le pueden agregar nutrientes complejos como son la peptona y el extracto de levadura al cual se le llama medio complejo. Otro medio de cultivo que se utiliza en ambos casos es el medio con sales, el cual consiste de la misma fuente de carbono pero difiere de los otros en que la fuente de nitrógeno es una fuente inorgánica tal como  $\text{NH}_4\text{OH}$ , puede emplearse o no un amortiguador y contiene sales de diferentes metales.

Tabla II

Condiciones de cultivo utilizadas en fermentaciones con *P. pastoris*.

	Matraz	Fermentador
Medio	Medio mínimo Medio mínimo suplementado Medio complejo Medio con sales	Medio con sales Medio con sales suplementado
Tipo de cultivo	Lote + lote alimentado	Lote + lote alimentado Lote + continuo
Temperatura	30 °C	30 °C
O <sub>2</sub>	aireación	>20%
Agitación	250 rpm.	500-1500 rpm.
pH	2-7	2-7
Tiempo de inducción	48 - 100 h	24 - 200 h

Sacado del capítulo Non conventional Yeasts in Biotechnology del libro *Pichia pastoris* (25).

#### 1.4 Justificación

Hasta ahora se conoce como afectan algunas condiciones ambientales en la proliferación de los peroxisomas en este tipo de levaduras y las enzimas involucradas en este proceso; sin embargo, se sabe poco acerca de como se ven afectados estos procesos por la presencia de genes heterólogos integrados en su genoma y sus productos sintetizados durante la activación de estos mecanismos. Considerando estos aspectos y tomando la ventaja de lo que se conoce sobre la regulación del gen *AOX*, el efecto de algunas condiciones ambientales y el proceso fermentativo, un estudio sobre cómo se afectan los procesos bioquímicos y celulares que se desencadenan en *P. pastoris* bajo condiciones de expresión de genes heterólogos al cambiar las condiciones de cultivo, podrá aportar una mejor comprensión de los mismos y así contribuir al desarrollo de

procesos fermentativos más controlados y dirigidos a la producción más eficiente de proteínas heterólogas en este hospedero.

### **1.5 Objetivo general**

**Evaluar la influencia de las condiciones de cultivo sobre los procesos bioquímicos y celulares relacionados con los mecanismos que regulan la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*.**

#### **1.5.1 Objetivos específicos**

- 1. Seleccionar de la literatura existente las condiciones y composición de los medios de cultivo que se someterán a estudio.**
- 2. Estandarizar los métodos a emplear para la evaluación de procesos bioquímicos y celulares.**
- 3. Evaluar y comparar, bajo las condiciones de cultivo a estudiar, los siguientes procesos bioquímicos y celulares: Crecimiento celular, actividad enzimática y concentración de la proteína recombinante, actividad enzimática de las enzimas peroxisomales alcohol oxidasa y catalasa, y la proliferación peroxisomal.**
- 4. Correlacionar los cambios bioquímicos y celulares con la producción de proteínas recombinantes.**

### **1.6 Modelo experimental**

**Para cumplir con los objetivos de este trabajo se escogió como modelo experimental la cepa GS115  $\beta$ -galactosidasa *Mut*<sup>+</sup> de *P. pastoris* (Invitrogen**

Corporation) la cual posee el gen *AOXI* intacto y funcional, tiene integrado el gen de  $\beta$ -galactosidasa en su genoma y la expresión de este gen está controlada por el promotor del gen *AOXI* (13, 29).

La  $\beta$ -galactosidasa es una enzima de importancia industrial que ha sido utilizada frecuentemente como un modelo excelente desde el punto de vista de Biología Molecular y tecnología de fermentaciones (22, 29) por el hecho de que su actividad es fácil de medir, el conocimiento sobre el operón de la lactosa y los estudios sobre su actividad catalítica. Esta enzima es un homotetrámero de 465 kDa de peso molecular, cada subunidad tiene un PM de 116 kDa y cataliza la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -glicosídicos entre glucosa y galactosa.

## **CAPITULO 2**

### **MATERIAL Y METODOS**

#### **2.1 Area de trabajo, reactivos y material biológico**

El desarrollo experimental de este trabajo de investigación se realizó en laboratorios de los Departamentos de Bioquímica, Microbiología e Histología de la Facultad de Medicina, y en los laboratorios del Programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Las enzimas y reactivos para la preparación de las diferentes soluciones provienen de Sigma Chemical Co. (*St Louis Mo, EUA*), otros reactivos provienen también de Productos Químicos Monterrey (*Monterrey, N.L., Méx.*), Pelco International (*Redding CA, EUA*), Difco (*Detroit, MI, EUA*), Invitrogen Corporation (*San Diego Ca, EUA*).

La cepa GS115  $\beta$ -galactosidasa de *P. pastoris* proviene de Invitrogen Corporation (*San Diego Ca, EUA*).

#### **2.2 Equipo**

Los equipos que se utilizaron para el desarrollo de este trabajo son los siguientes: Estufa FELISA modelo 131, cuarto caliente a 30°C, campana de acrílico, S/P Vortex Mixer, microcentrifugas Eppendorf modelos 5413 y 5415, centrífuga Beckman modelo J-6B espectrofotómetros Beckman DU-70, Beckman Epson Action Printer 4000,

Spectronic Genesys 2 y Turner modelo 340, balanza analítica Mettler modelo AE163, balanza digital marca Sartorius modelo 1206MP (Camibh Göttingen Germany), potenciómetro ORION modelo 601 A, placa de calentamiento Thermolyne cimarec 2 modelo SP46925, agitador Lab-Line Orbit no. 3590 (Melrose Park, ILL.), ultracongelador Cryo-fridge American Scientific Products, bloque de calentamiento Thermolyne tipo 17600 mod DB17615, ultramicrotomo LKB Ultratome, microscopio electrónico Zeiss modelo EM109, congelador a -20°C Torrey.

El procesamiento de datos se realizó en una computadora COMPAQ PRESARIO 2253. Se utilizó el procesador de texto *Microsoft Word for office 97* (© 1983-97 Microsoft Corporation), procesador de gráficos *Microsoft Power Point for office 97*, y hoja de cálculo *Microsoft Excel for office 97*. La captura de imágenes se realizó con un equipo *HP Scan Jet 3200 C*.

La búsqueda de información bibliográfica se realizó a través de *Medline* y *bancos de patentes*, ambos vía internet.

### 2.3 Estrategia general experimental

Se seleccionaron de la literatura las condiciones y composición del medio de cultivo a través de Medline y banco de patentes, vía internet (Figura 2).

Los métodos utilizados para la evaluación de los procesos bioquímicos y celulares estudiados, se estandarizaron determinando la repetibilidad (variación en un mismo día) y reproducibilidad (variación en diferentes días) de cada método, expresados como coeficientes de variación de tres repeticiones. Además se aseguró que en la determinación de las actividades enzimáticas se trabajara siempre en la zona de respuesta lineal de la reacción (Figura 2).

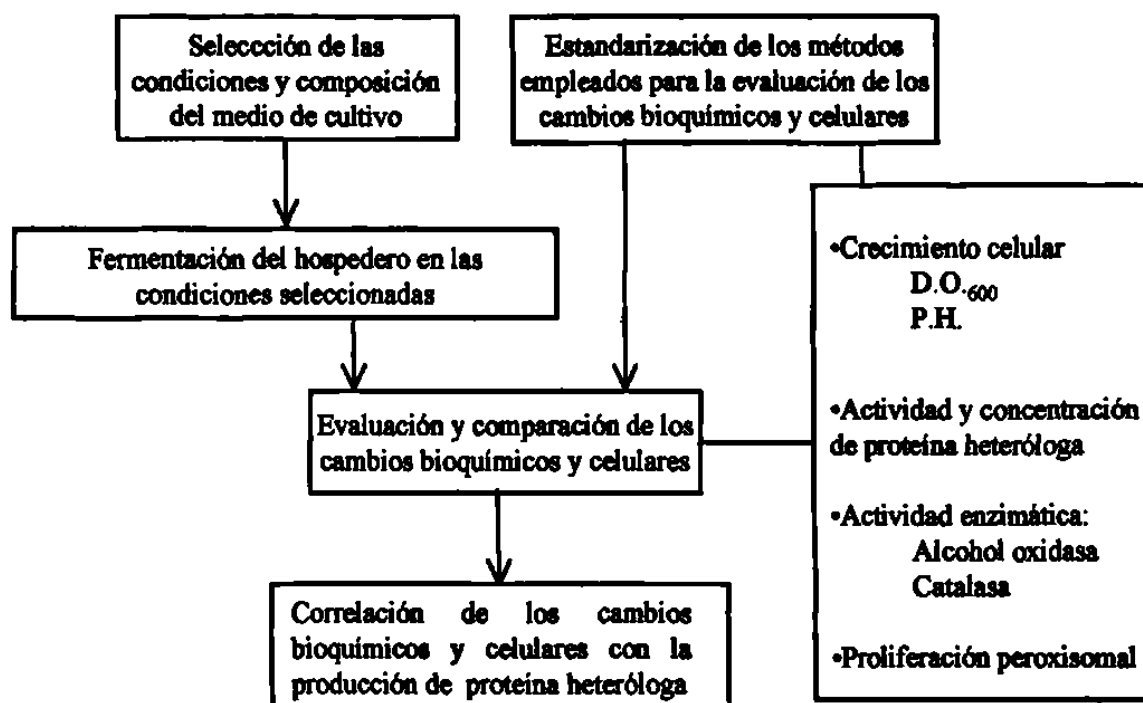


Figura 2. Estrategia general experimental. Se muestran los pasos seguidos para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo.

La cepa GS115  $\beta$ -galactosidasa de *P. pastoris* se cultivó, por triplicado, en cuatro medios de cultivo diferentes, utilizando un cultivo en lote alimentado con metanol cada 24 h durante 72 h. A las 3, 27, 51 y 72 h de inducción con metanol, de cada cultivo se evaluaron los siguientes procesos bioquímicos y celulares: Crecimiento celular medido por D.O.<sub>600</sub> y peso húmedo (P.H.), proliferación peroxisomal por microscopía electrónica, actividad y concentración de  $\beta$ -galactosidasa por el método descrito por Miller (13, 17), actividad enzimática de alcohol oxidasa por el método descrito por Jansen et al (14, 15), actividad enzimática de catalasa por el método de Aebi (1) y concentración de proteínas intracelulares solubles por el método de Bradford (2). Adicionalmente a los tiempos de inducción mencionados se hizo una comparación de la influencia de la composición del medio de cultivo sobre los parámetros evaluados, empleando las pruebas estadísticas de análisis de varianza y la prueba de comparación



múltiple de Newman (36). Por último, se determinó la correlación entre la proteína recombinante y los procesos bioquímicos celulares evaluados con la prueba de correlación lineal de Pearson (36) (Figura 2).

## 2.4 Métodos

### 2.4.1 Selección de las condiciones y composición de los medios de cultivo

Para la selección de las condiciones y composición del medio de cultivo se realizó una búsqueda bibliográfica relacionada con *P. pastoris* a través de Medline y en los bancos de patentes, vía internet. De estos artículos se seleccionaron las condiciones de cultivo más empleadas para el cultivo de esta levadura, así como aquellas en las que utilizaron algunos nutrientes específicos para aumentar la producción de la proteína recombinante producida.

### 2.4.2 Estandarización de los métodos empleados

Para la estandarización de las técnicas utilizadas para la evaluación de los procesos bioquímicos y celulares se determinó la repetibilidad (variación de la técnica en un mismo día) y reproducibilidad (variación de la técnica en diferentes días) de cada técnica determinando el coeficiente de variación (C.V.) en un mismo día y en diferentes días. Los cálculos se realizaron con el programa *Microsoft Excel for office 97*, con la fórmula siguiente (17):

$$C.V. = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Donde  $s$  es la desviación estándar de los datos y  $\bar{x}$  es el promedio de los datos.

### 2.4.2.1 Actividad enzimática de $\beta$ -galactosidasa

La actividad de  $\beta$ -galactosidasa se determinó empleando el método espectrofotométrico descrito por Miller (13, 17) el cual se basa en determinar el producto de la reacción de hidrólisis del compuesto *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosido (ONPG) por la acción de esta enzima a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 420 nm. Se preparó una solución de  $\beta$ -galactosidasa comercial (*Sigma, St Louis Mo, EUA*) a una concentración de 1 U/mL. Se determinó la concentración de proteínas de esta solución por el método de Bradford (ver sección 2.4.2.4). El ensayo enzimático consistió en equilibrar el buffer Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  60 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  40 mM, KCl 10 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM, pH 7.0), la solución de ONPG (4 mg/mL) y el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M a 28°C. Posteriormente, se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de la solución de la enzima a 1 mL de buffer Z y se equilibró a 28°C (bloque de calentamiento Thermolyne). Como un control de hidrólisis espontánea del ONPG, se agregaron 30  $\mu\text{L}$  del buffer de lisis a 1 mL de buffer Z. Para iniciar la reacción, se agregaron 0.2 mL de ONPG a cada uno de los tubos anteriores. Se incubaron los tubos a 28°C durante 12 min (tiempo en el cual apareció un color ligeramente amarillo y que debe ser mayor de 10 min). La reacción se detuvo agregando 0.5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M a cada tubo. Se leyó la  $\text{D.O.}_{420}$  contra el control en el espectrofotómetro DU-70 Beckman. Las U/mg de la solución se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\text{D.O.}_{420} \times 380}{(\text{min } 28^\circ\text{C})(\text{mg proteína en reacción})}$$

Donde 380 es una constante usada para convertir la lectura de  $\text{D.O.}_{420}$  a Unidades.

Para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad se determinó siete veces la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en un mismo día y veinte veces en diferentes días.

#### 2.4.2.2 Actividad enzimática de AOX

La actividad enzimática de la AOX se determinó empleando el método descrito por Janssen (14) que se basa en la medición de la formación del radical catiónico del compuesto 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) de amonio (ABTS). Este radical catiónico se forma debido a la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el ABTS, reacción que es catalizada por una peroxidasa; el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es producido por la oxidación del metanol, reacción que es catalizada por la AOX (14, 15).

Para llevar a cabo la reacción enzimática, en una celda de plástico se agregaron 1.4 mL de ABTS 2 mM y 5 µL de Peroxidasa 250 U/mL, se mezcló por inversión y se equilibró a 25°C. Se calibró a cero de absorbancia a 405 nm (espectrofotómetro Beckman DU-70). Se agregaron 50 µL de AOX 0.1 U/mL y 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.003%, se mezcló por inversión y se monitoreó la absorbancia a 405 nm hasta que permaneció constante. Después se agregaron 50 µL de metanol 1%, se mezcló por inversión inmediatamente y se registró el incremento de absorbancia a 405 nm durante 5 min.

También se corrió un blanco de la reacción enzimática, la reacción del blanco se realizó como se mencionó anteriormente, pero en lugar de agregar 50 µL de AOX 0.1 U/mL se agregaron 50 µL de buffer de fosfatos 100 mM.

Se obtuvo el incremento de absorbancia ( $\Delta A$ ) por min a 405 nm del blanco y de la AOX y se calcularon las U/mL de la AOX con la siguiente fórmula:

$$\frac{U}{mL} = \frac{(\Delta A_{405}/\text{min AOX} - \Delta A_{405}/\text{min blanco})(1.51)(FD)}{(36.8)(0.05)}$$

Donde: FD es el factor de dilución, 1.51 es el volumen total del ensayo en mL, 36.8 es el coeficiente de absorción milimolar del ABTS a 405 nm y 0.05 es el volumen de muestra usado en mL.

La actividad de AOX se determinó por triplicado para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica, y se corroboró que se trabajó en la zona lineal de la reacción determinando el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de la recta obtenida al graficar la absorbancia del ABTS oxidado *versus* el tiempo en min.

#### 2.4.2.3 Actividad enzimática de catalasa

Para la medición de la actividad enzimática de la catalasa se empleó el método de Aebi (1) el cual se basa en la medición de la disminución de la absorbancia a 240 nm del  $H_2O_2$  por la disminución de la concentración del  $H_2O_2$  debido a la acción de la catalasa sobre este compuesto. Se preparó una solución de catalasa de rábano comercial (*Sigma, St Louis Mo, EUA*) a una concentración de 14500 U/mL. Se mezclaron 950  $\mu$ L de buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0 con 40  $\mu$ L de la solución de catalasa, con esta mezcla se calibró a cero de absorbancia en el espectrofotómetro DU-70 Beckman a una  $\lambda$  de 240 nm, por último se agregaron 10  $\mu$ L de  $H_2O_2$  al 6%, se mezcló por inversión y se registró la absorbancia cada min durante seis min a una temperatura de 25°C.

Las U/mL de la solución enzimática se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\frac{U}{mL} = \Delta A_{240}/min \times 692.5$$

Donde 692.5 es el factor obtenido en base al coeficiente de absorción molar del  $H_2O_2$  y al factor de dilución de la muestra en la reacción.

Esta medición se realizó cinco veces en un mismo día para determinar la repetibilidad y quince veces en diferentes días para determinar la reproducibilidad de la técnica. Para corroborar que se trabajó en la zona lineal de la reacción se graficó la

absorbancia del  $H_2O_2$  a 240 nm *versus* tiempo en min y se determinó el coeficiente de correlación lineal de la recta.

#### 2.4.2.4 Determinación de proteínas totales

Para la estandarización de las proteínas totales por el método de Bradford (2) se utilizó albúmina sérica bovina (ASB) como estándar, se preparó un estándar primario a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  y a partir de esta solución se realizó la curva de calibración indicada en la tabla III, cada estándar se preparó por triplicado.

Tabla III

Curva de calibración de ASB

Estándar ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\mu\text{L}$ de ASB 50 $\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{L}$ de agua destilada	$\mu\text{L}$ de reactivo de Coomassie
0.0	0	200	800
1.0	20	180	800
1.5	30	170	800
3.0	60	140	800
4.5	90	110	800
6.0	120	80	800
9.0	180	20	800

Los reactivos se mezclaron por agitación en vortex, se incubó a temperatura ambiente por dos min, se calibró a cero de absorbancia con el blanco a 595 nm en el espectrofotómetro DU-70 Beckman y se midieron las absorbancias de los estándares. Se graficaron las lecturas de absorbancia contra la concentración de los estándares y se determinó el  $r^2$  y la pendiente de la recta de calibrado. Esta curva se realizó tres veces en un mismo día para determinar la repetibilidad y siete veces en diferentes días para

evaluar la reproducibilidad, las cuales fueron evaluadas comparando las pendientes de la recta de calibrado.

#### 2.4.2.5 Lisis celular

La técnica de lisis celular se basa en una lisis mecánica por agitación con perlas de vidrio lavadas con ácido nítrico diluido. Para que la lisis celular sea eficiente se debe trabajar con una suspensión celular que tenga una D.O.<sub>600</sub> de 50-100 (13). La estandarización de la lisis celular consistió en determinar el número de lavados en los que se recupera la mayor parte de proteína intracelular soluble, siendo la concentración de catalasa el parámetro evaluado para determinar el número de lavados.

A partir de un cultivo de la levadura *P. pastoris* GS115  $\beta$ -galactosidasa se prepararon 100  $\mu$ L de una suspensión celular con una D.O.<sub>600</sub> ~100 en buffer de lisis (Buffer de fosfato de potasio 10 mM, pH 7.4 con DTE 0.5 mM y PMSF 1 mM), el cultivo se centrifugó a 7000 rpm a 4°C durante 10 min (Centrifuga Beckman mod. J-6B9), se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 100  $\mu$ L de buffer de lisis. Se agregaron 0.2 g de perlas de vidrio lavadas con ácido nítrico diluido (correspondiente a un volumen igual de la suspensión celular). El paquete celular resuspendido, se sometió a diez ciclos de agitación en vortex por 30 s (S/P Vortex Mixer) y enfriamiento en hielo por 30 s. Se centrifugó a 4°C durante 5 min a 10,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se realizaron una serie de lavados a las perlas de vidrio agregando 100  $\mu$ L de buffer de lisis, agitando en vortex y centrifugando entre cada lavado. Se determinó la actividad de catalasa y cantidad de proteína recombinante a cada lavado.

#### 2.4.2.6 Proliferación peroxisomal

Para la estandarización del método para evaluar la proliferación peroxisomal, se realizó el procesamiento de levaduras para Microscopía Electrónica haciendo cambios en el tiempo de fijación y de inclusión con respecto al protocolo utilizado normalmente para procesar levaduras en el laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina. Se tomaron micrografías electrónicas de las preparaciones donde se evaluó que la morfología de la célula se apreciara bien, es decir, que los organelos estuvieran bien definidos y que las células estuvieran bien fijadas y contrastadas.

El paquete celular de 100  $\mu\text{L}$  de un cultivo de *P. pastoris* GS115  $\beta$ -galactosidasa se obtuvo por centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min (microcentrifuga Eppendorf modelo 5413), se lavó el paquete celular con 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli Q, se agitó en el vortex (S/P Vortex Mixer), se centrifugó y se decantó el sobrenadante, este paso de lavado se repitió una vez más. Las células se fijaron agregando 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{KMnO}_4$  al 1.5%, se agitó en el vortex y se dejó a temperatura ambiente durante 45 min, se centrifugó y el paquete celular se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  Milli Q hasta que el sobrenadante tuvo un color transparente. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de acetato de uranilo al 1%, se agitó en el vortex, se centrifugó durante 15 min a 14 000 rpm y las muestras se dejaron en acetato de uranilo mínimo 1 h, o en el refrigerador hasta que se procesaron para igualar todas las muestras. Posterior a la tinción con acetato de uranilo se realizó la deshidratación de las células agregando 400  $\mu\text{L}$  de etanol a las siguientes concentraciones y tiempos: 1) etanol 50% 15 min, 2) etanol 70% 15 min, 3) etanol al 96% por 15 min (en este paso se guardó un vial de la muestra en el refrigerador, por si acaso la inclusión en epón tuviera algún inconveniente ya había una muestra extra), 4) etanol al 100% por 15 min, 5) etanol al 100% por 60 min, en cada paso de deshidratación, al agregar el etanol se agitó en el

vortex, se dejó a temperatura ambiente el tiempo indicado y después de este tiempo se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 min y el sobrenadante se desechó. Después de la deshidratación se agregaron 500  $\mu$ L de óxido de propileno al 100%, se agitó en el vortex, se dejó a temperatura ambiente por 15 min y se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 min y el sobrenadante se eliminó, este paso se repitió una vez más. La preinclusión se realizó agregando 500  $\mu$ L de epón-óxido de propileno 1:1, se agitó en el vortex, se dejó una hora y media a temperatura ambiente, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 500  $\mu$ L de epón-óxido de propileno 3:1, se agitó en el vortex y se dejó durante 48 h a temperatura ambiente. Se agregaron 500  $\mu$ L de epón puro durante 1 h tres veces a temperatura ambiente (al agregar el epón, el paquete celular se agitó con un aplicador de madera, y se dejó a temperatura ambiente el tiempo indicado, se centrifugó y se desechó el sobrenadante cada vez). Los desechos de cada paso se colocaron en un recipiente para desechos tóxicos. Se realizó la inclusión en la estufa incubando toda la noche a 60°C. Se sacaron los tubos de la estufa y se sacaron los bloques de los tubos para realizar cortes finos en un ultramicrotomo LKB Ultratome los cuales se contrastaron con acetato de uranilo. Por último se observó al Microscopio Electrónico (Zeiss, EM106) y se obtuvieron micrografías electrónicas para observar la estructura de la célula. Los cortes finos y la toma, revelado e impresión de las micrografías electrónicas se realizaron en el Depto. de Histología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

### 2.4.3 Fermentación

Para cumplir con los objetivos de este estudio se realizaron tres fermentaciones de *P. pastoris*  $\beta$ -galactosidasa desfasadas en tiempo a las condiciones de cultivo seleccionadas, en todos los medios de cultivo escogidos a la vez en cada fermentación.



La fermentación consistió de dos fases: fase de crecimiento y fase de inducción, ambas fases se llevaron a cabo por igual en cada fermentación (7, 9).

#### 2.4.3.1 Fase del crecimiento celular

Las levaduras de *P. pastoris*  $\beta$ -galactosidasa, conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  en 50% de glicerol fueron reactivadas inoculando 25 mL de caldo de extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD) con 10  $\mu\text{L}$  de la cepa conservada a  $-70^{\circ}\text{C}$  en un matraz erlenmeyer de 250 mL, se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  a 250 rpm (cuarto caliente a  $30^{\circ}\text{C}$  en un agitador Lab-Line) durante 48 h, tiempo en el cual se alcanzó una  $D.O_{.600} \sim 20$  (Espectrofotómetro Spectronic). Se realizó un cultivo inicial en cada medio de cultivo seleccionado, empleando como fuente de carbono glicerol, tomando  $\sim 0.375$  mL del cultivo reactivado para inocular 50 mL de medio con glicerol e iniciar con una  $D.O_{.600}$  de 0.15. Este cultivo se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  a 250 rpm hasta alcanzar una  $D.O_{.600}$  de 4.0. De este cultivo en glicerol se tomó 6.25 mL y se llevó a 50 mL con el mismo medio para tener una  $D.O_{.600}$  de 0.5 y se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  a 250 rpm hasta alcanzar una  $D.O_{.600}$  de 1.4 (Figura 3) (7, 9).

#### 2.4.3.2 Fase de inducción

Se obtuvo el paquete celular del cultivo en glicerol centrifugando a la velocidad máxima durante 10 min en la centrifuga Beckman modelo J-6B, este paquete celular se resuspendió en 50 mL del mismo medio pero ahora con metanol como fuente de carbono y se incubó durante 72 h a  $30^{\circ}\text{C}$  a 250 rpm, se añadió metanol cada 24 h a una concentración de 0.75% (7, 9) (Figura 3).

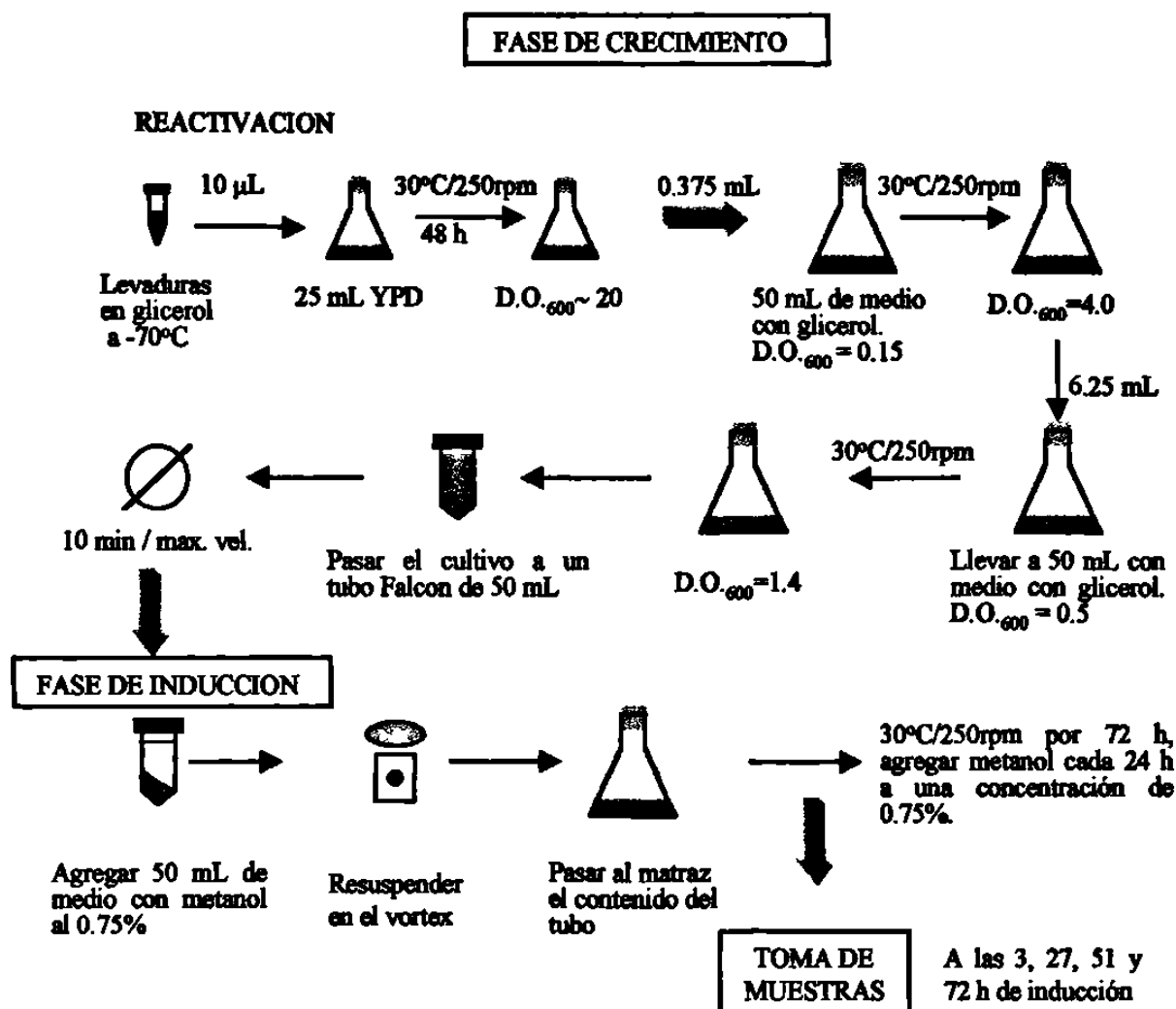


Figura 3. Representación esquemática del ensayo de fermentación llevado a cabo en este estudio.

#### 2.4.4 Evaluación y comparación de procesos bioquímicos y celulares

Para la evaluación de los procesos bioquímicos y celulares que se analizaron en este estudio (crecimiento celular, actividad enzimática de la proteína recombinante y de las enzimas AOX y catalasa, concentración de proteína intracelular soluble y proliferación peroxisomal) se tomaron muestras durante la fase de inducción de cada fermentación para evaluar cada parámetro estudiado a las 3, 27, 51 y 72 h de inducción (Figura 4), los tres primeros tiempos correspondieron a 3 h después de un pulso de

metanol. Para cada parámetro evaluado se determinó la media, desviación estándar y el error estándar de las tres fermentaciones para determinar el coeficiente de variación del error estándar de la media ( $CV_{\text{EEM}}$ ) (17).

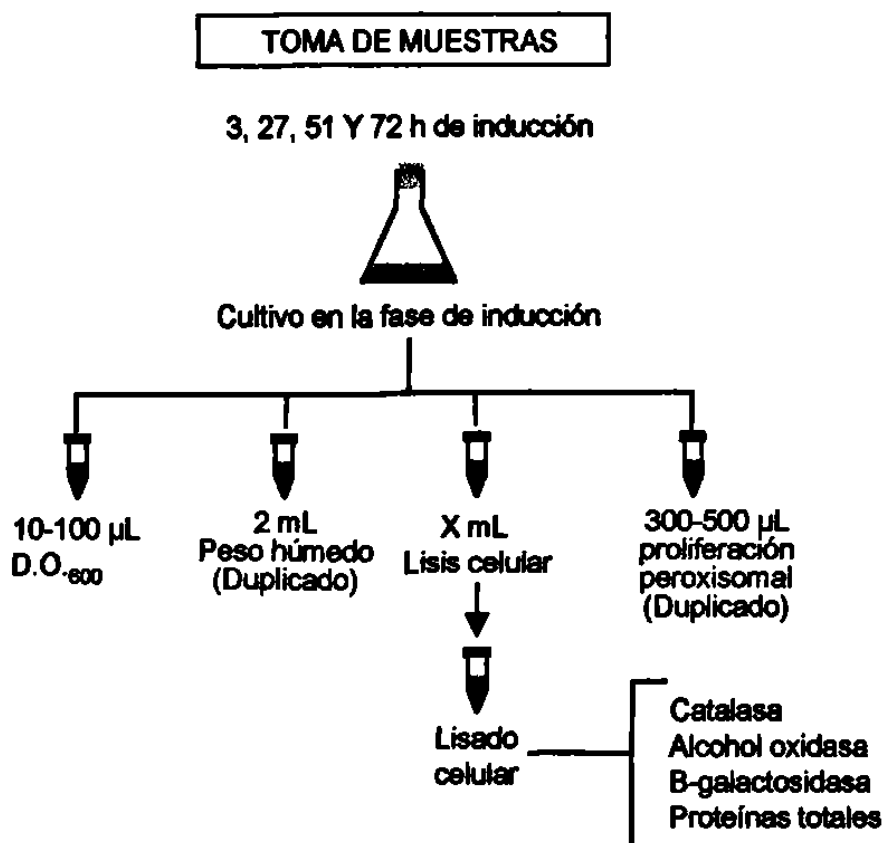


Figura 4. Estrategia seguida para la toma de muestras para evaluar los procesos bioquímicos y celulares.

La comparación de los procesos bioquímicos y celulares evaluados en diferentes medios de cultivo se realizó con las pruebas estadísticas de análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Newman (36) con ayuda del programa computacional *Microsoft Excel for office 97*, se compararon los datos obtenidos para

cada parámetro evaluado a cada tiempo de inducción establecido en los diferentes medios de cultivo entre sí, siendo el nivel de significancia de 0.05.

#### 2.4.4.1 Evaluación y comparación del crecimiento celular

El crecimiento celular se evaluó determinando la cinética de crecimiento de la levadura en cada medio de cultivo en estudio midiendo la absorbancia a 600 nm ( $D.O_{600}$ ) y el peso húmedo (P.H.) (19).

2.4.4.1.1 Cinética de crecimiento evaluada por  $D.O_{600}$ . Se prepararon diluciones adecuadas ( $D.O_{600} < 0.5$ ) de los cultivos en agua destilada y se midió la absorbancia de estas diluciones a los diferentes tiempos en un espectrofotómetro Turner y/o Spectronic calibrado a cero de absorbancia con agua destilada a 600 nm. La  $D.O_{600}$  del cultivo se obtuvo multiplicando la absorbancia a 600 nm por el factor de dilución, se graficó esta densidad óptica *versus* tiempo de inducción en gráfico semilogarítmico y se calculó la velocidad de crecimiento específica y el tiempo de generación de la levadura. La velocidad de crecimiento específica se determina calculando la pendiente de la recta correspondiente a la fase exponencial de crecimiento utilizando el logaritmo natural de las  $D.O_{600}$  y el tiempo de generación se determina dividiendo el logaritmo natural de 2 entre la velocidad de crecimiento específica (Figura 5).

2.4.4.1.2 Cinética de crecimiento evaluada por peso húmedo. Se tomaron 2 mL de cultivo de cada medio estudiado, se centrifugaron en un tubo eppendorf de 2 mL previamente etiquetado y pesado a 14,000 rpm por 10 min (centrifuga eppendorf modelo 5415), el sobrenadante se desechó y se pesó el tubo con el paquete celular. Esta determinación se realizó a cada tiempo de inducción especificado, por duplicado, para cada cultivo (Figura 5).

El peso húmedo de la levadura se calculó con la siguiente fórmula:

$$P.H. \left( \frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Peso del tubo con el paquete celular (g)} - \text{Peso del tubo (g)}}{\text{Volumen de cultivo (L)}}$$

La comparación de la influencia del medio de cultivo en el crecimiento celular se realizó con las pruebas estadísticas mencionadas en la sección 2.4.4.

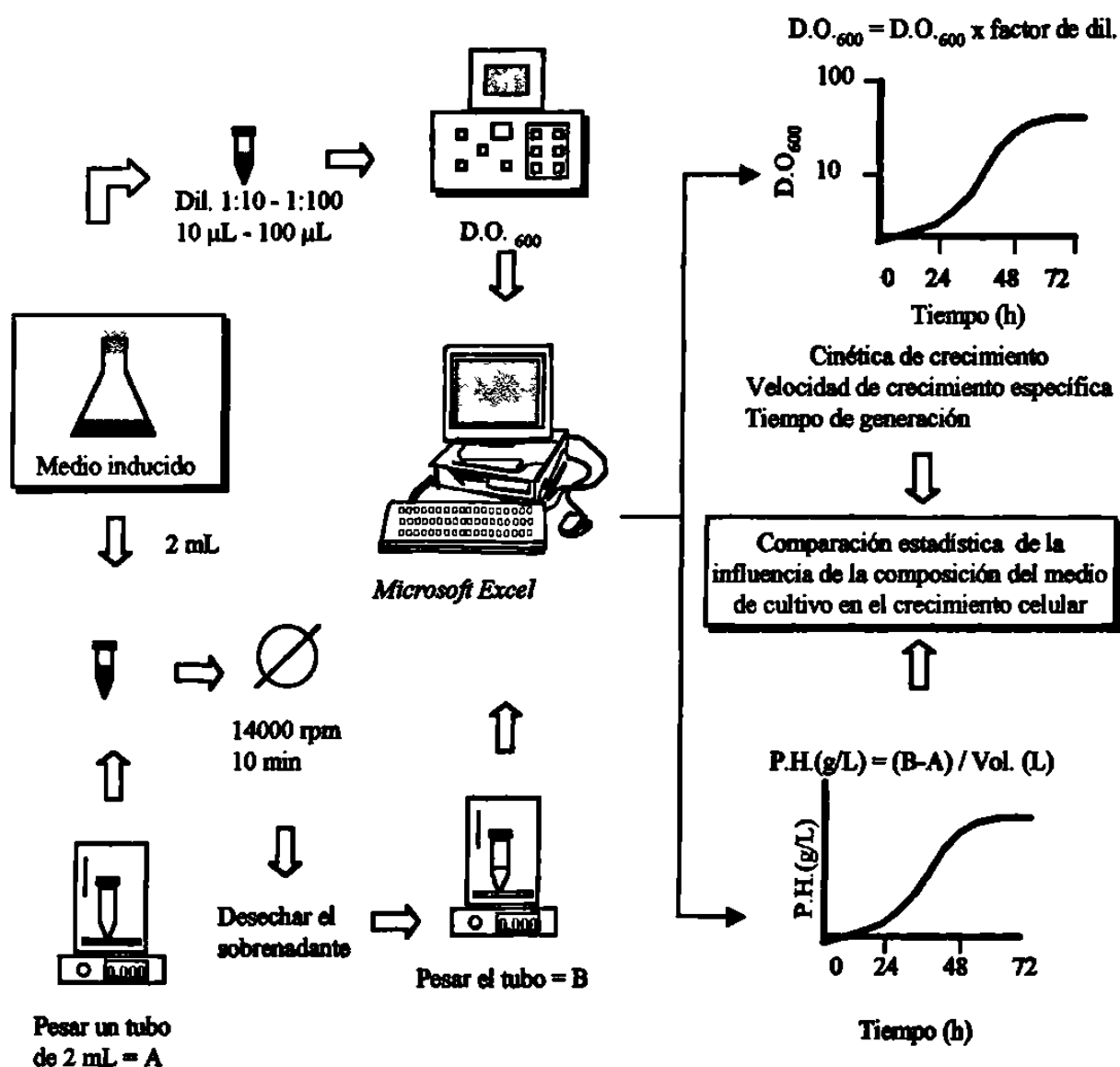


Figura 5. Pasos efectuados para la comparación del crecimiento celular de la levadura entre todos los medios de cultivo seleccionados a los tiempos de inducción establecidos.

#### 2.4.4.2 Lisis celular

Para la lisis celular se tomaron alicuotas del cultivo dependientes de la D.O.<sub>600</sub> del mismo en el momento en que se tomó la muestra para tener 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión celular con una D.O.<sub>600</sub>  $\sim 100$ . Se tomó una alicuota de cada cultivo en estudio a los tiempos especificados y el procedimiento de lisis celular se realizó como se describió en la sección 2.4.2.5. El número de lavados que se hicieron fue en base a los resultados obtenidos en esta sección, se juntaron los lavados con el lisado celular y se llevó a un volumen fijo con buffer de lisis para tener el mismo volumen de lisado para cada muestra (Figura 11). A cada lisado celular se le realizaron las siguientes determinaciones: Actividad enzimática y concentración de proteína recombinante, actividad enzimática de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa y determinación de proteínas totales (Figura 6).

#### 2.4.4.3 Evaluación y comparación de la actividad enzimática de $\beta$ -galactosidasa

La actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa se determinó por triplicado a cada muestra como está descrito en la sección 2.4.2.1. (Figura 6), preparando diluciones pertinentes (dilución en la cual el color amarillo de la reacción apareciera en 10 min mínimo) para cada lisado celular. Además de las U/mg también se calculó las U/mL y la velocidad aparente de síntesis ( $V_{AS}$ ) en U/mgh (esta velocidad es la suma de las velocidades de síntesis y degradación de la enzima), con las siguientes fórmulas:

$$\frac{U}{mL} = \left( \frac{U}{mg} \right) \left( \frac{mg}{mL} \text{ de proteína total} \right)$$

$$V_{AS} = \left( \frac{U}{mg} t_2 - \frac{U}{mg} t_1 \right) / (t_2 - t_1)$$

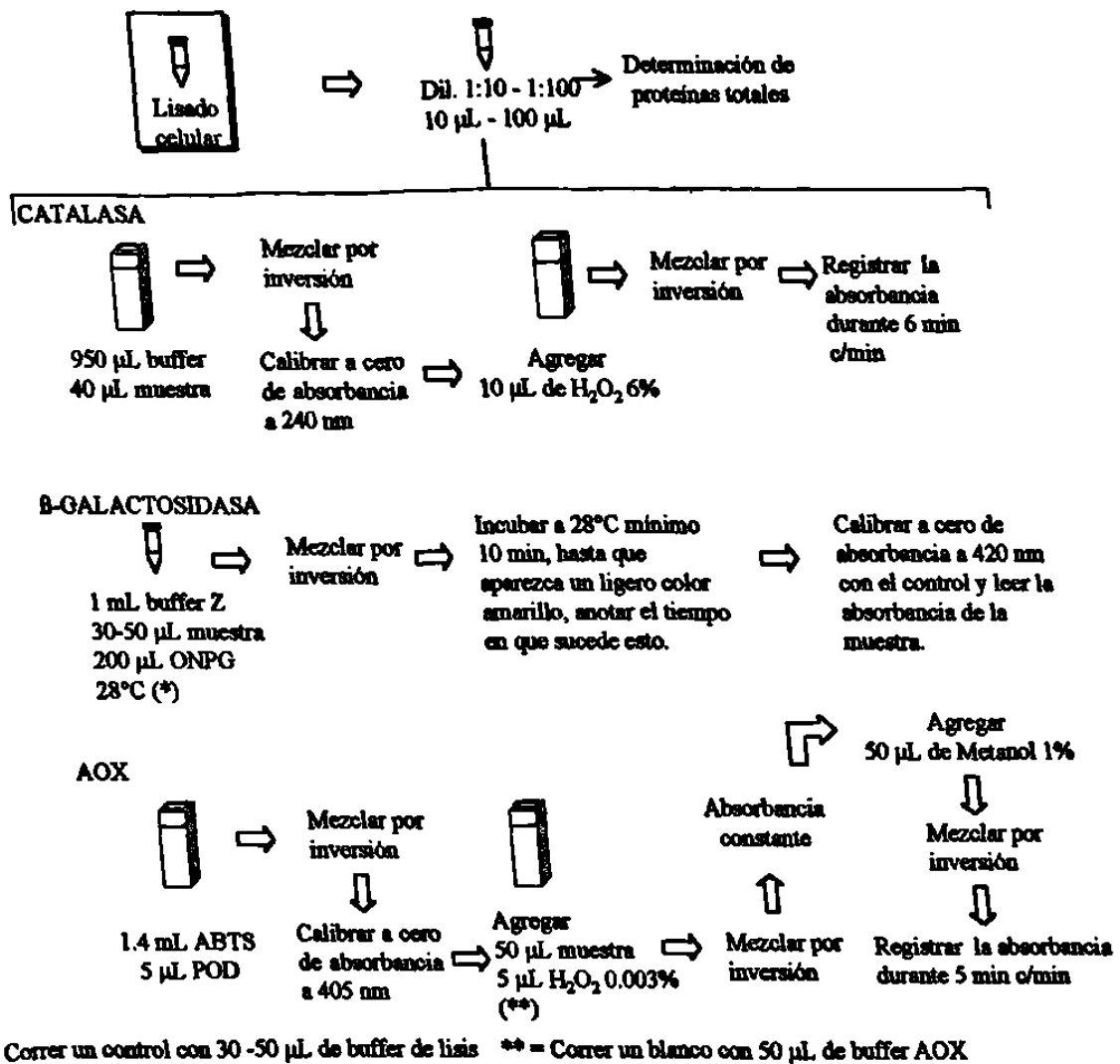


Figura 6. Representación esquemática de la estrategia experimental para evaluar las actividades enzimáticas de las enzimas peroxisomales y de la proteína recombinante.

Para la comparación de la actividad enzimática y la  $V_{AS}$  entre los medios de cultivo seleccionados se emplearon las pruebas estadísticas mencionadas en la sección 2.4.4 (Figura 7).

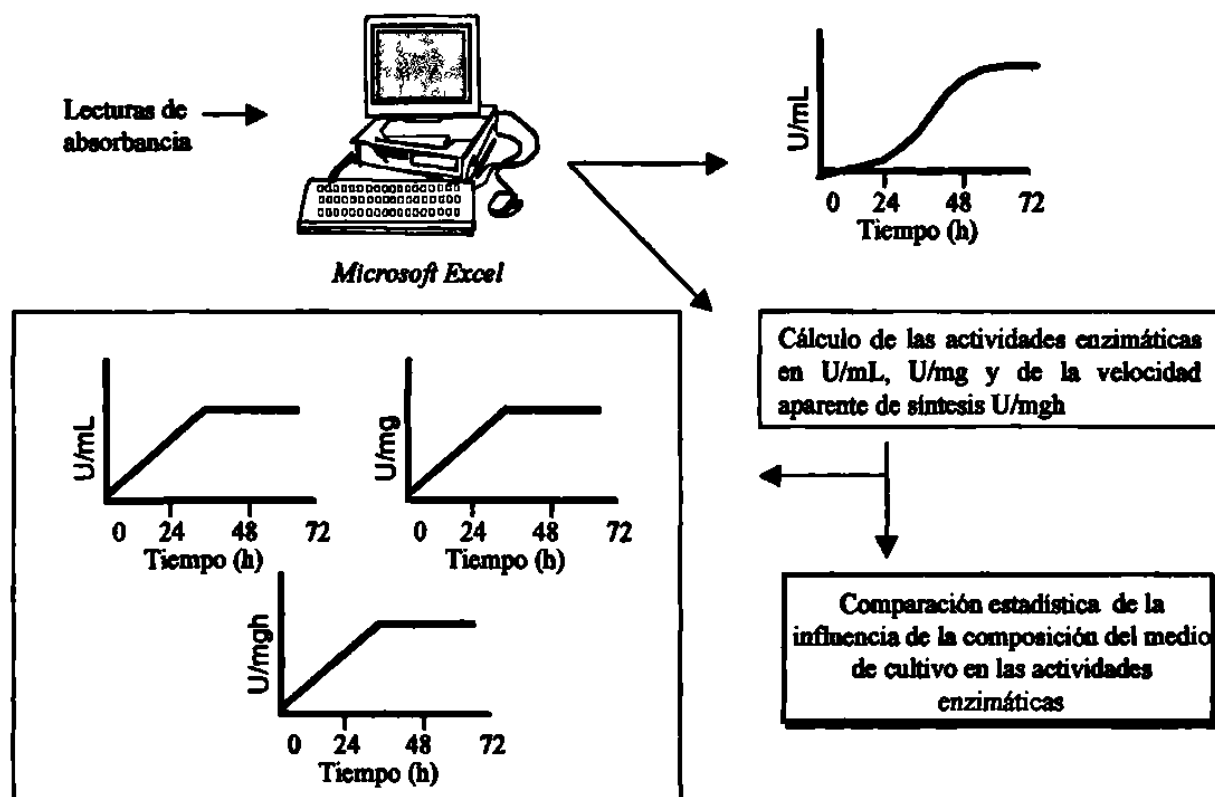


Figura 7. Estrategia seguida para evaluar y comparar las actividades enzimáticas de las enzimas peroxisomales y de la proteína recombinante.

#### 2.4.4.4 Evaluación y comparación de la actividad enzimática de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa

Las actividades enzimáticas de la AOX y catalasa se determinaron por triplicado para cada muestra de lisado celular como está descrito en las secciones 2.4.2.2 y 2.4.2.3 respectivamente (Figura 6). Se prepararon diluciones pertinentes para cada lisado celular (asegurándose que la dilución con la que se trabajó estaba en la zona lineal de la reacción). Además de las U/mL también se calculó las U/mg y la  $V_{AS}$  (ver sección



2.4.4.3). Para la comparación de la actividad enzimática y la  $V_{AS}$  entre los medios de cultivo seleccionados se emplearon las pruebas estadísticas mencionadas en la sección 2.4.4 (Figura 7).

#### 2.4.4.5 Comparación de la concentración de proteína intracelular soluble

Para la determinación de la concentración de proteína intracelular soluble se realizó una curva de calibración como está descrito en la sección 2.4.2.4. Se prepararon diluciones adecuadas de cada lisado celular (asegurándose de que los valores de absorbancia al hacer la reacción estuvieran dentro de la curva de calibración). Se tomó un volumen determinado de cada dilución, se llevó a 200  $\mu\text{L}$  con agua destilada y se agregaron 800  $\mu\text{L}$  del reactivo azul de Coomassie, las muestras se agitaron en el vortex, se dejaron dos min a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas se determinó con la ecuación de la recta de calibrado y la comparación de la influencia de la composición del medio de cultivo en la concentración de proteínas intracelulares se realizó con las pruebas estadísticas mencionadas en la sección 2.4.4.

#### 2.4.4.6 Comparación de la proliferación peroxisomal

Para evaluar la proliferación peroxisomal de *P. pastoris*  $\beta$ -galactosidasa cultivada en los diferentes medios de cultivo se procedió como está descrito en la sección 2.4.2.6, el volumen de muestra que se tomó varió con respecto al tiempo de inducción, a las 3 y 27 h se tomaron 400  $\mu\text{L}$  de cada cultivo y a las 51 y 72 h se tomaron 100  $\mu\text{L}$  para tener una cantidad suficiente de paquete celular. La comparación de la influencia de las condiciones de cultivo sobre la proliferación peroxisomal se realizó haciendo una

comparación morfológica del número, volumen y área citoplásmica ocupada por los peroxisomas en la célula para cada muestra.

#### 2.4.5 Correlación de los cambios bioquímicos y celulares con la producción de $\beta$ -galactosidasa

La correlación de la proteína recombinante con los procesos bioquímicos y celulares se determinó con la prueba estadística de correlación lineal de Pearson, siendo el valor crítico del coeficiente de correlación ( $r$ ) igual a 0.57 a un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 y 10 grados de libertad (36).

## CAPITULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Selección de las condiciones y composición de los medios de cultivo

Las condiciones de cultivo seleccionadas para llevar a cabo este estudio se muestran en la tabla IV (7, 9, 13, 25), y consisten de una fermentación a nivel matraz, siendo la cantidad de oxígeno disuelto en el cultivo la proporcionada por la agitación del matraz a 250 rpm, se decidió trabajar a un pH de 6.0, con un tiempo de inducción total de 72 h y a una concentración inicial de metanol en el medio de cultivo de 0.75 %.

Tabla IV

Condiciones de cultivo seleccionadas para fermentaciones a nivel matraz con *P. pastoris*.

Temperatura	30°C
O <sub>2</sub> disuelto	Aireación
Agitación	250 rpm
pH	6.0
Tiempo de inducción	72 h
Densidad óptica al inicio de la inducción	1.4
Concentración inicial de metanol	0.75%

De los medios de cultivo descritos en la literatura y que se han utilizado en fermentaciones a nivel matraz de *P. pastoris* se seleccionaron los siguientes cuatro

medios de cultivo: medio mínimo (MM), medio mínimo suplementado con aminoácidos y vitaminas (MMAV), medio mínimo suplementado con ácido palmítico (MMAG) y medio con sales (MS). Los cuatro medios de cultivo utilizan glicerol ó metanol como fuente de carbono y energía, y nitrógeno base de levadura (YNB) como fuente de nitrógeno, excepto el medio con sales el cual utiliza amoníaco como fuente de nitrógeno, los cuatro medios de cultivo en su composición contienen diferentes micronutrientes los cuales se listan en la tabla V (13, 16, 20, 25).

El cultivo se inició a partir de un inóculo en fase exponencial de un cultivo en lote empleando glicerol como fuente de carbono. La D.O.<sub>600</sub> inicial fue de 1.4 y se realizó un cultivo en lote alimentado con metanol como fuente de carbono suministrado a una concentración de 0.75% cada 24 h (7, 9, 13).

### **3.2 Estandarización de los métodos empleados para la evaluación de procesos bioquímicos y celulares**

#### **3.2.1 Actividad enzimática de $\beta$ -galactosidasa**

El coeficiente de variación (C.V.) obtenido para la actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa en un mismo día fue de 6.7% y el obtenido con las evaluaciones de diferentes días fue de 16.9%. En la tabla VI se muestran los resultados de la estandarización de esta técnica donde además del C.V. se incluye el número de determinaciones (n), el valor promedio de n determinaciones ( $\bar{x}$ ) y la desviación estándar (s).

Tabla V

Composición de los medios de cultivo seleccionados para el desarrollo experimental de este trabajo de investigación

Medio de cultivo	Fuente de C	Concentración	Fuente de N <sub>2</sub>	Concentración	Micronutrientes	Concentración
Medio mínimo (MM) (12)	Glicerol Metanol	1% 0.75%	YNB	13.4 g/L	Biotina	400 µg/L
Medio mínimo suplementado con aminoácidos y vitaminas (MMAV) (12, 19)	Glicerol Metanol	1% 0.75%	YNB	13.4 g/L	AA Lis, Leu, Met, Ile, Glu Vitaminas: Riboflavina Tiamina Ac. Nicotínico Ac. fólico Biotina	5 mg/L:  2 µg/L 2 µg/L 4 µg/L 0.03 µg/L 400 µg/L
Medio mínimo suplementado con ácido graso (MMAG) (12, 15)	Glicerol Metanol	1% 0.75%	YNB	13.4 g/L	Biotina Ac. Palmítico	400 µg/L 0.05%
Medio con sales (MS) (25)	Glicerol Metanol	1% 0.75%	NH <sub>4</sub> OH	~1.9%	Biotina Sales basales: *H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 2.21%, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 18.2g/L, CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.93 g/L, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 14.9 g/L, KOH 4g/L. Sales Ptm 1: *CuSO <sub>4</sub> 24 mM, NaI 0.53 mM, MnSO <sub>4</sub> 19.87 mM, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , ZnCl <sub>2</sub> 0.15 mM, Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.23 mM, CoCl <sub>2</sub> , 2.1 mM H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> 0.32 mM, NaMoO <sub>4</sub> 0.83 mM	400 µg/L 82.5% 18.2g/L, 0.93 g/L, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 4g/L. 0.668% 0.53 mM, MnSO <sub>4</sub> 0.15 mM, 2.1 mM H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> 0.83 mM

\* La concentración de las sales de metales para las sales basales y sales Ptm 1 es con respecto a la solución de sales basales y sales Ptm 1 respectivamente, no con respecto al medio de cultivo.

### 3.2.2 Actividad enzimática de AOX

La repetibilidad y la reproducibilidad obtenidas fueron de 2.63% y de 14.67%, respectivamente, como se muestra en la tabla VI. En la Figura 8 se muestra el gráfico de la absorbancia a 405 nm del radical catiónico del ABTS con respecto al tiempo, la cual aumentó debido a la acción de la AOX. En el intervalo de tiempo evaluado se obtuvieron coeficientes de correlación lineal mayores de 0.998 lo cual indica que se trabajó en la zona lineal de la reacción. La absorbancia del blanco permaneció constante durante el tiempo de reacción.

### 3.2.3 Actividad enzimática de catalasa

La repetibilidad y la reproducibilidad obtenidas fueron de 8.1% y de 12.3%, respectivamente, como se muestra en la tabla VI. En la Figura 8 se muestra el gráfico de la absorbancia a 240 nm del  $H_2O_2$  con respecto al tiempo, la cual disminuye debido a la acción de la catalasa. En el intervalo de tiempo evaluado se obtuvieron coeficientes de correlación lineal mayores de 0.965 lo cual indica que se trabajó en la zona lineal de la reacción.

### 3.2.4 Determinación de proteínas totales

Para la técnica de la determinación de proteínas totales (P.T.) la repetibilidad y la reproducibilidad obtenidas fueron de 3.1% y 3.8%, respectivamente (tabla VI). En la recta de calibración se obtuvieron coeficientes de correlación mayores de 0.992 (Figura 9).

Tabla VI

Repetibilidad y reproducibilidad obtenidas en la estandarización de los diferentes métodos empleados en este estudio.

Método	Parámetro	Repetibilidad	Reproducibilidad
Actividad específica de $\beta$ -galactosidasa	n	7	20
	$\bar{x}$ (U/mg)	24285	21115
	s	1623	3563
	C.V. (%)	6.7	16.9
Actividad enzimática de AOX	n	3	3
	$\bar{x}$ (U/mL)	0.148	0.083
	s	0.0039	0.0122
	C.V. (%)	2.63	14.67
Actividad enzimática de Catalasa	n	5	15
	$\bar{x}$ (U/mL)	5823	6838
	s	468	839
	C.V. (%)	8.1	12.3
Concentración de P.T.	n	3	7
	$\bar{x}$	0.062	0.060
	s	0.0019	0.0023
	C.V. (%)	3.1	3.8

n = No. de determinaciones,  $\bar{x}$  = promedio, s = desviación estándar y C.V. = coeficiente de variación.

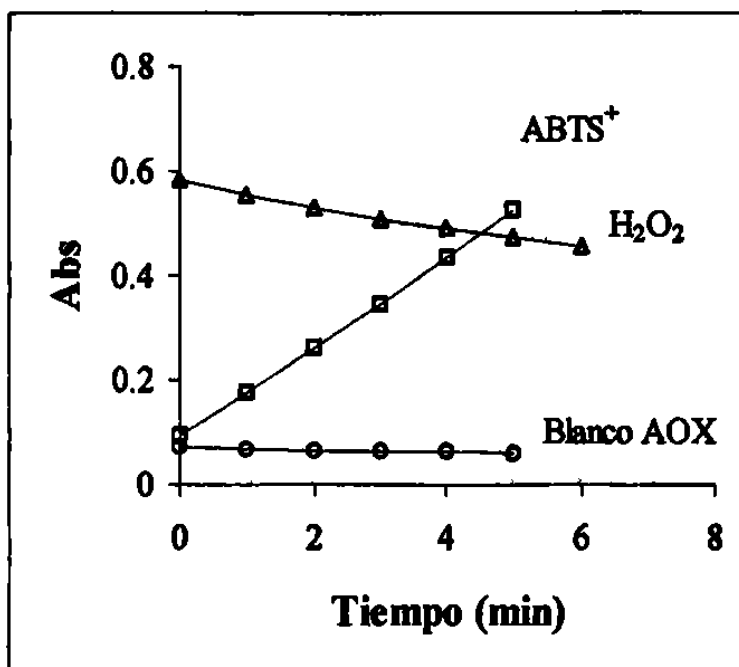


Figura 8. Cambio de la absorbancia a lo largo del tiempo obtenida durante la estandarización de la determinación de la actividad enzimática de AOX y catalasa.  $-\Delta-$  = lecturas de absorbancia a 240 nm del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $r^2 > 0.965$ ;  $-\square-$  = lecturas de absorbancia a 405 nm del ABTS<sup>+</sup>,  $r^2 > 0.998$ ;  $-\circ-$  = lecturas de absorbancia del blanco de AOX.

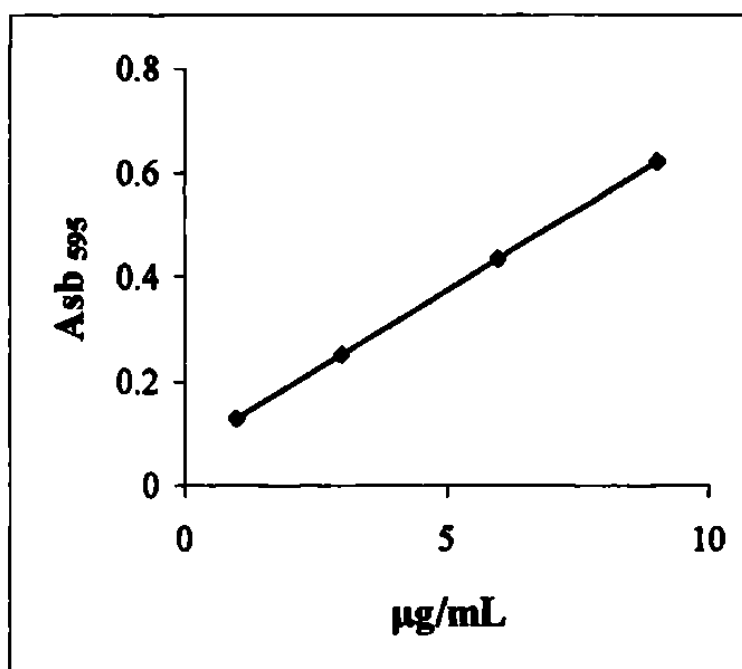


Figura 9. Recta de calibración para la determinación de proteínas totales, se utilizó como estándar ASB y se obtuvo un  $r^2 > 0.992$ .



### 3.2.5 Lisis celular

Para la estandarización del método de lisis celular se determinó la actividad enzimática de catalasa en los sobrenadantes de los lavados de las perlas de vidrio la cual mostró una disminución con respecto al número de lavados. En la figura 10 se muestra la actividad de catalasa en los diferentes lavados, se observó que a partir del quinto lavado la actividad de catalasa fue mínima comparada a la del primer lavado y permaneció prácticamente constante. En base a estos resultados se decidió hacer 5 lavados a las perlas de vidrio en el protocolo de lisis celular, juntar estos lavados y llevarlos a un volumen fijo de 1 mL para que las proteínas estuvieran diluidas por igual. En la Figura 11 se muestra el procedimiento de lisis celular que se llevó a cabo en el desarrollo de este trabajo.

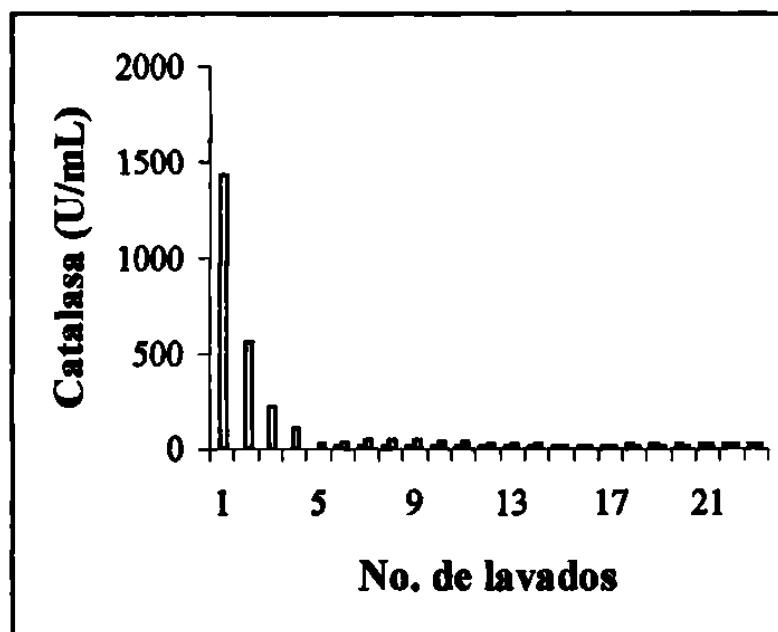


Figura 10. Actividad de catalasa en los lavados de las perlas de vidrio durante la estandarización del método de lisis celular.

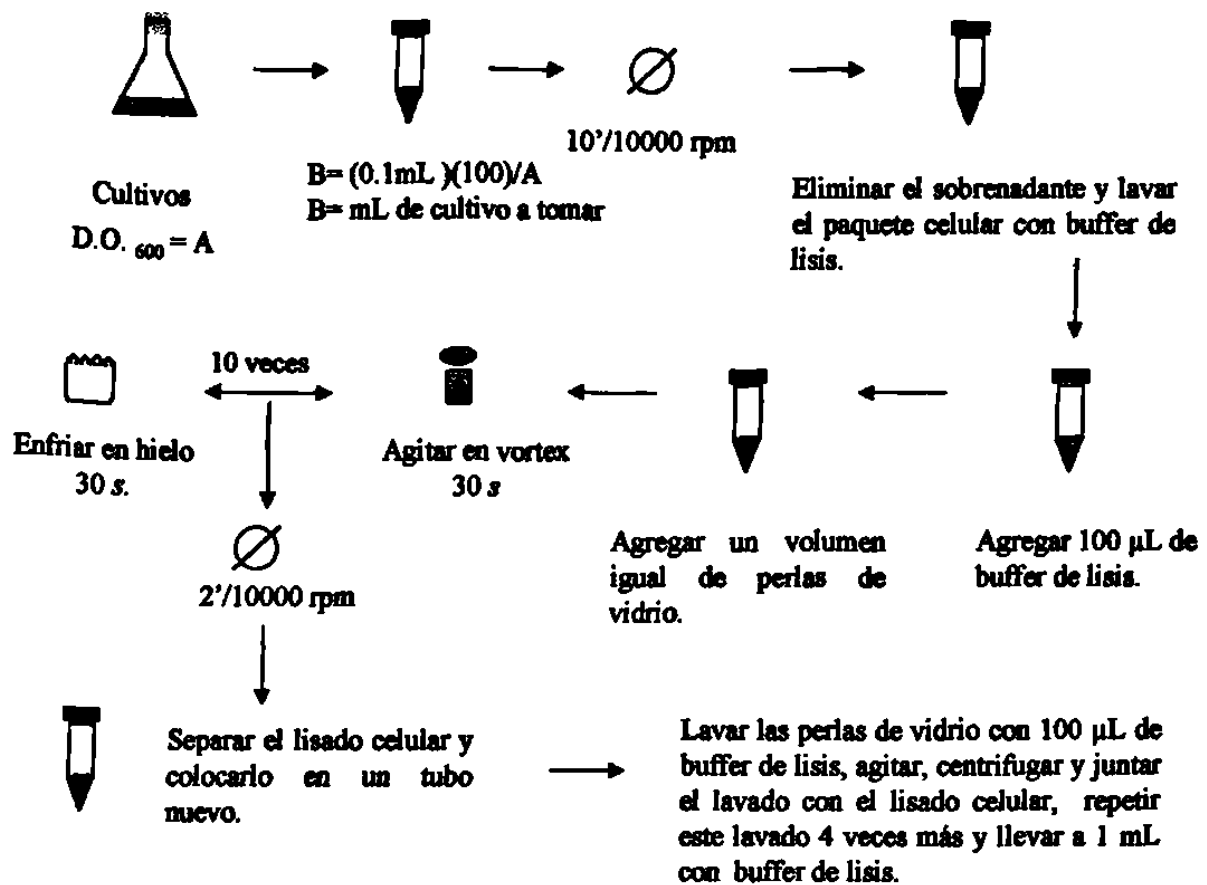


Figura 11. Método de lisis celular que se realizó en este trabajo de investigación.

### 3.2.6 Proliferación peroxisomal

En la Figura 12 se muestran micrografías electrónicas donde se observa la morfología de la levadura *P. pastoris*  $\beta$ -galactosidasa cultivada en glicerol (Figura 12 A) y metanol como fuente de carbono (Figura 12 B). En el cultivo en glicerol la célula mostró un citoplasma homogéneo, el núcleo, mitocondrias y vacuola estuvieron bien definidos y en el cultivo en metanol las células inducidas mostraron una morfología similar a la del cultivo en glicerol observándose además los peroxisomas electrodensos y bien definidos.

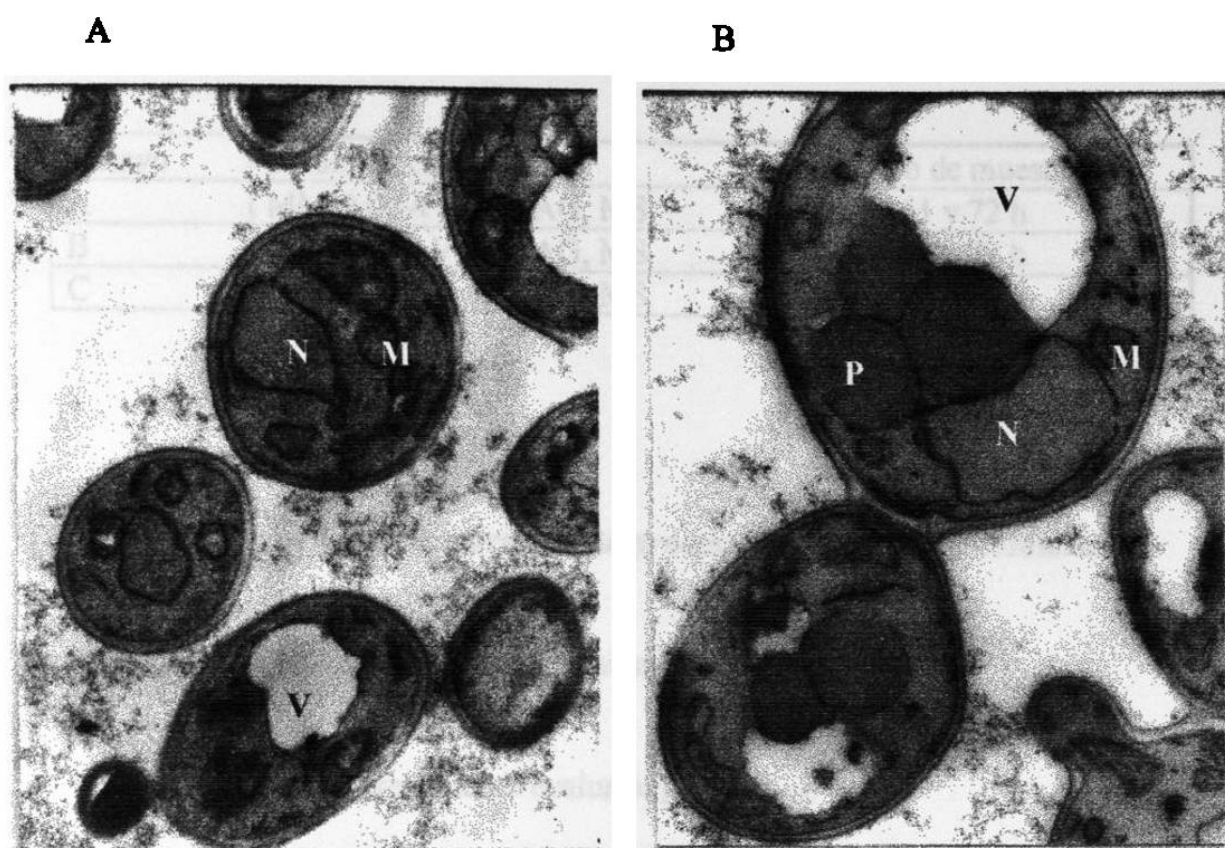


Figura 12. Micrografías electrónicas de *P. pastoris* GS115  $\beta$ -galactosidasa cultivada en glicerol A) y metanol B) como fuente de carbono y energía durante 48 h. P = peroxisomas, V = vacuola, N = núcleo, M = mitocondria. Aumento 12,000 X.

### 3.3 Fermentación de la cepa GS115 $\beta$ -galactosidasa de *P. pastoris*

En la tabla VII se indican los ensayos de fermentación de la levadura *P. pastoris* GS115  $\beta$ -galactosidasa realizados para evaluar y comparar los procesos bioquímicos y celulares a las condiciones de cultivo escogidas y a los tiempos de inducción establecidos.

Tabla VII

Ensayos de fermentación realizados en este estudio

Ensayo	Medio de cultivo	Tiempo de muestreo
A	MM, MMAV, MMAG, MS	3, 27, 51 y 72 h
B	MM, MMAV, MMAG, MS	3, 27, 51 y 72 h
C	MM, MMAV, MMAG, MS	3, 27, 51 y 72 h

### 3.4 Evaluación y comparación de procesos bioquímicos y celulares

#### 3.4.1 Evaluación y comparación del crecimiento celular

##### 3.4.1.1 Cinética de crecimiento evaluada por D.O.<sub>600</sub>

Las cinéticas de crecimiento celular de la cepa *P. pastoris* GS115  $\beta$ -galactosidasa evaluadas midiendo la D.O.<sub>600</sub> durante la fase de inducción, en los cuatro medios de cultivo estudiados, mostraron comportamientos similares. En todos los medios de cultivo durante las primeras horas de inducción, el crecimiento celular mostró un incremento con respecto al tiempo y a partir de las 51 h tendió a permanecer constante (Figura 13). En el gráfico semilogarítmico de la D.O.<sub>600</sub> versus tiempo de inducción se logra apreciar la zona de separación entre las fases exponencial y estacionaria de crecimiento entre las 27 y 51 h de inducción, sin embargo no se logra observar la fase lag de crecimiento debido a que se partió de un cultivo en fase exponencial (Figura 13).

Los resultados del análisis estadístico para comparar el crecimiento celular entre los cuatro medios de cultivo evaluados a cada tiempo de inducción, con las pruebas estadísticas mencionadas en la sección 2.4.4, no mostraron diferencias significativas.

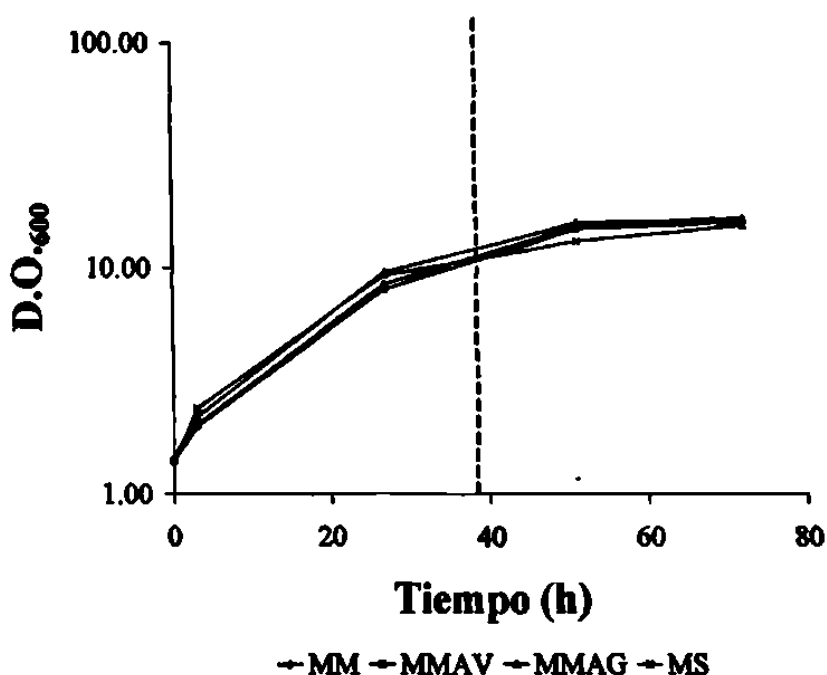


Figura 13. Representación en gráfico semilogarítmico del crecimiento celular determinado por D.O.<sub>600</sub> de *P. pastoris* GS115 β-galactosidasa, en los cuatro medios de cultivo estudiados bajo condiciones de inducción. Cada curva representa la cinética de crecimiento obtenida en cada medio de cultivo empleado y cada punto de la curva el valor promedio de tres determinaciones. La línea punteada indica la separación de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. C.V.<sub>FEM</sub> < 18.8%

La influencia de los medios de cultivo en el crecimiento celular también se evaluó comparando la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de generación de la célula, obtenidos en cada medio de cultivo y no se obtuvieron diferencias significativas entre los cuatro medios evaluados. El valor promedio de la velocidad específica de crecimiento de todos los medios de cultivo obtenido fue de  $0.06 \text{ h}^{-1}$  (Figura 14A) y del tiempo de generación 11 h (Figura 14B).

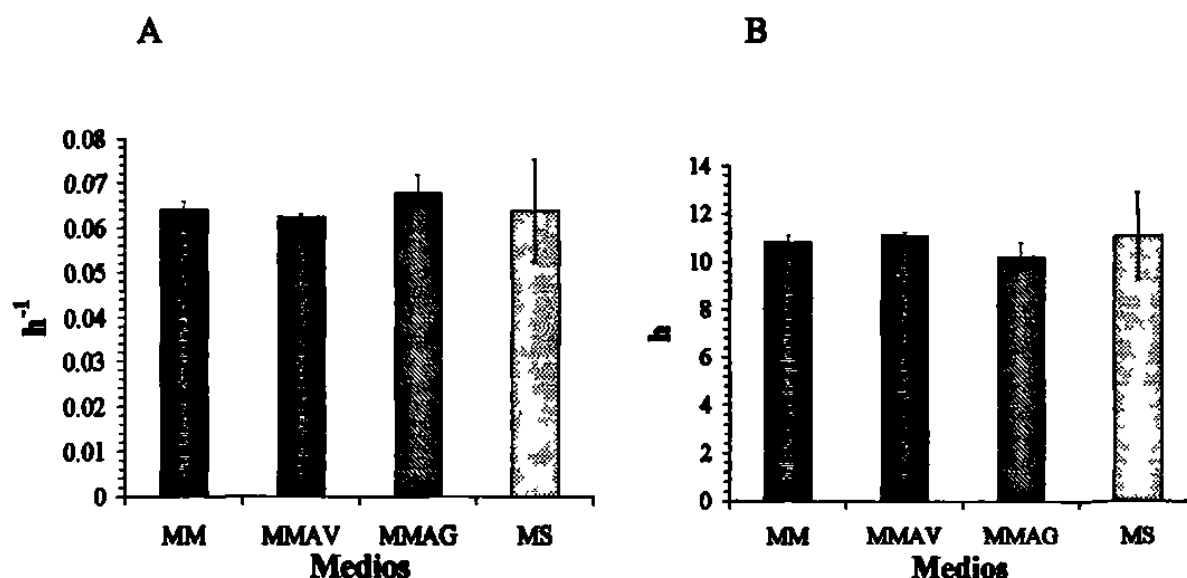


Figura 14. Velocidad específica de crecimiento A) y tiempo de generación B) de *P. pastoris* GS115  $\beta$ -galactosidasa a las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo.  $n = 3$ ,  $C.V_{REM} < 10.3\%$ .

### 3.4.1.2 Cinética de crecimiento evaluada por peso húmedo

El crecimiento celular de la levadura *P. pastoris* GS115  $\beta$ -galactosidasa evaluado midiendo el peso húmedo (P.H.) durante la fase de inducción en los cuatro medios de cultivo estudiados mostró un comportamiento similar al evaluado por D.O.<sub>600</sub>. El P.H. del paquete celular de 2 mL de cultivo fue aumentando con respecto al tiempo de inducción en los cuatro medios de cultivo, tal como se muestra en la Figura 15. La comparación del crecimiento celular evaluado a través de este parámetro mostró los mismos resultados que con la D.O.<sub>600</sub> ya que al realizar el análisis estadístico a cada tiempo de inducción no se observaron diferencias significativas entre estos medios de cultivo.

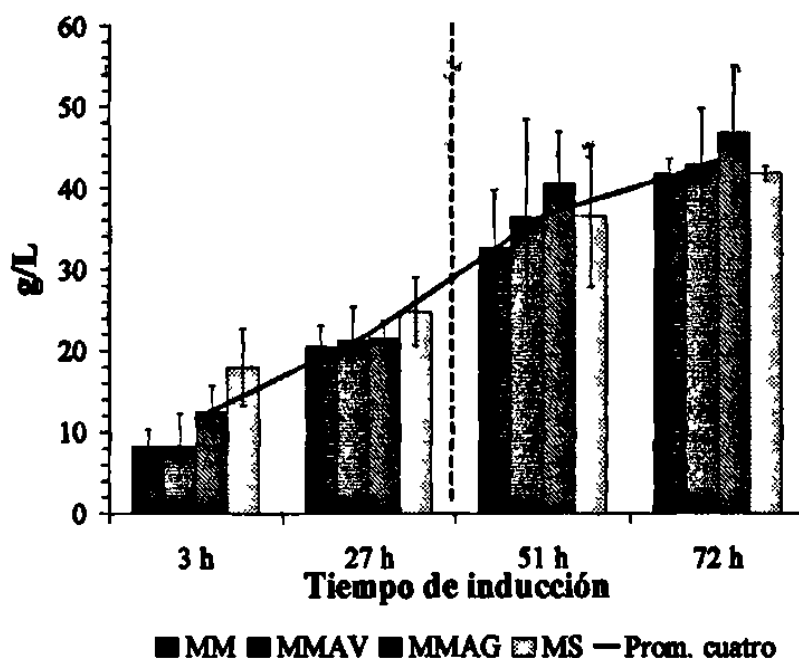


Figura 15. Peso húmedo de *P. pastoris* GS115  $\beta$ -galactosidasa en los medios de cultivo evaluados bajo condiciones de inducción. Cada barra representa a un medio de cultivo y la altura representa el valor promedio  $\pm$  una desviación estándar. La curva representa el promedio de los P.H. vs tiempo de los cuatro medios de cultivo evaluados. La línea punteada indica la separación de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento;  $n = 6$ ,  $C.V._{EEM} < 25\%$ .

### 3.4.2 Evaluación y comparación de la actividad enzimática de $\beta$ -galactosidasa

La concentración de  $\beta$ -galactosidasa biológicamente activa fue aumentando con respecto al tiempo en los cuatro medios de cultivo durante la fase exponencial de crecimiento y tendió a permanecer constante en la fase estacionaria (Figura 16), aunque este comportamiento se observó en menor grado en el medio con sales, en el cual se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la fase exponencial de crecimiento con valores menores de concentración de  $\beta$ -galactosidasa que en los otros medios que no mostraron diferencias significativas entre sí. Sin embargo, durante la fase estacionaria de

crecimiento la concentración de  $\beta$ -galactosidasa en el medio con sales se igualó a los otros medios. La concentración de esta enzima por litro de cultivo es un reflejo directo de la cantidad de producto acumulado, el cual también fue aumentando con respecto al tiempo durante la fase de inducción.

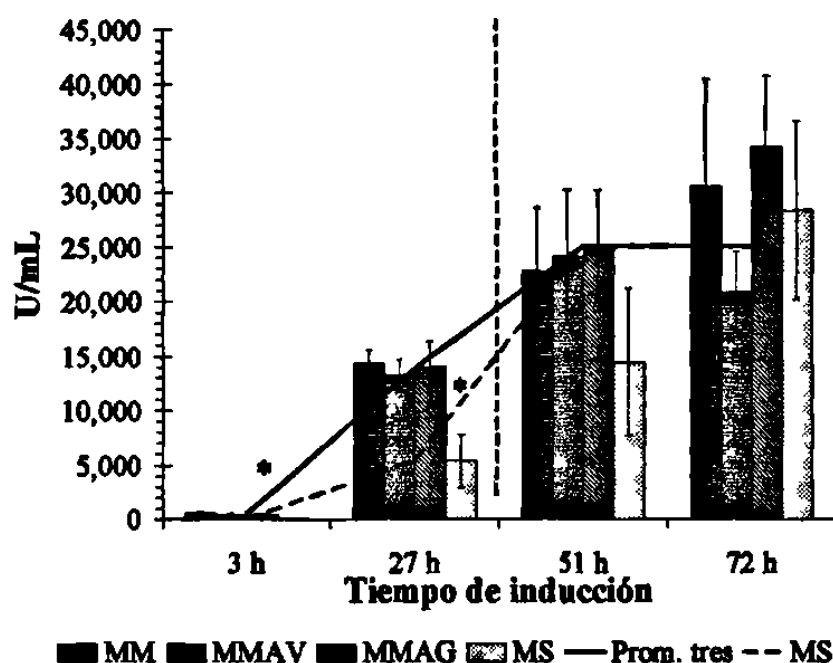


Figura 16. Concentración de  $\beta$ -galactosidasa por litro de cultivo durante la fase de inducción en los cuatro medios de cultivo estudiados. Cada barra representa a un medio de cultivo y la altura representa el valor promedio  $\pm$  una desviación estándar. Las curvas representan la curva promedio de la concentración de  $\beta$ -galactosidasa vs tiempo de los medios mínimos (—) y la equivalente para el medio con sales (---). La línea punteada vertical indica la separación de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. Se encontraron diferencias significativas en el medio con sales a las 3 y 27 h (\*) con una  $p < 0.05$ ;  $n = 9$ ,  $C.V_{EEM} < 20\%$ .

La actividad específica o concentración intracelular de la  $\beta$ -galactosidasa no mostró diferencias significativas entre los medios de cultivo. En la Figura 17 se observa que la actividad específica de esta proteína recombinante aumentó a lo largo del tiempo



en el cultivo en metanol durante las primeras 27 h de inducción y después de este tiempo la actividad específica de esta enzima permaneció constante.

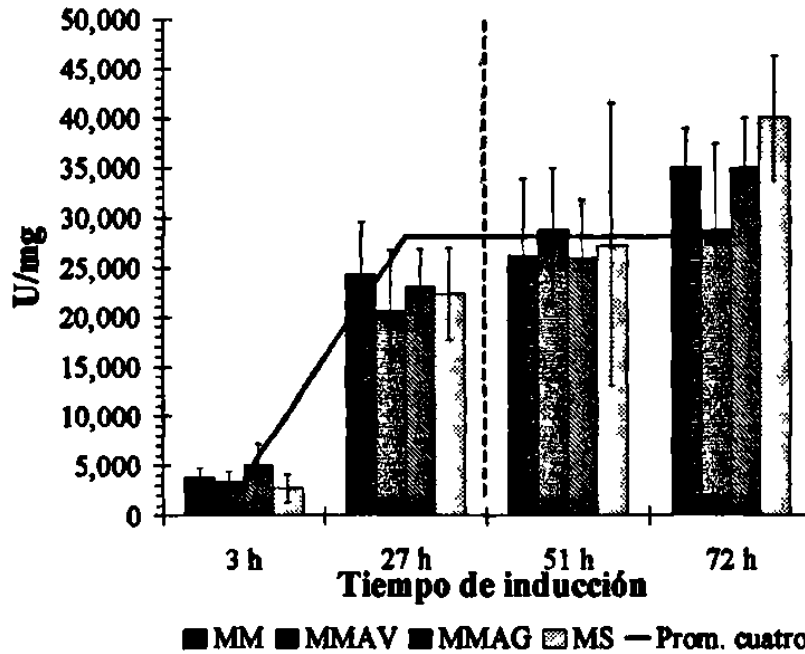


Figura 17. Actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa en *P. pastoris* GS115  $\beta$ -galactosidasa en los medios de cultivo evaluados bajo condiciones de inducción. Cada barra representa a un medio de cultivo y la altura representa el valor promedio  $\pm$  una desviación estándar. La curva representa el promedio de actividad específica vs tiempo de los medios mínimos y del medio con sales. La línea punteada indica la separación de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento;  $n = 9$ ,  $C.V_{EEM} < 17\%$ .

Al igual que en la actividad específica, en el análisis estadístico de las velocidades aparentes de síntesis de la  $\beta$ -galactosidasa, que es la sumatoria de las velocidades de síntesis y de degradación de esta proteína recombinante, no se encontraron diferencias significativas. La velocidad aparente de síntesis fue mayor a las 3 h de inducción y mostró una disminución durante las primeras 51 h del cultivo en metanol y tendió a permanecer constante después de este tiempo de inducción (Figura 18).

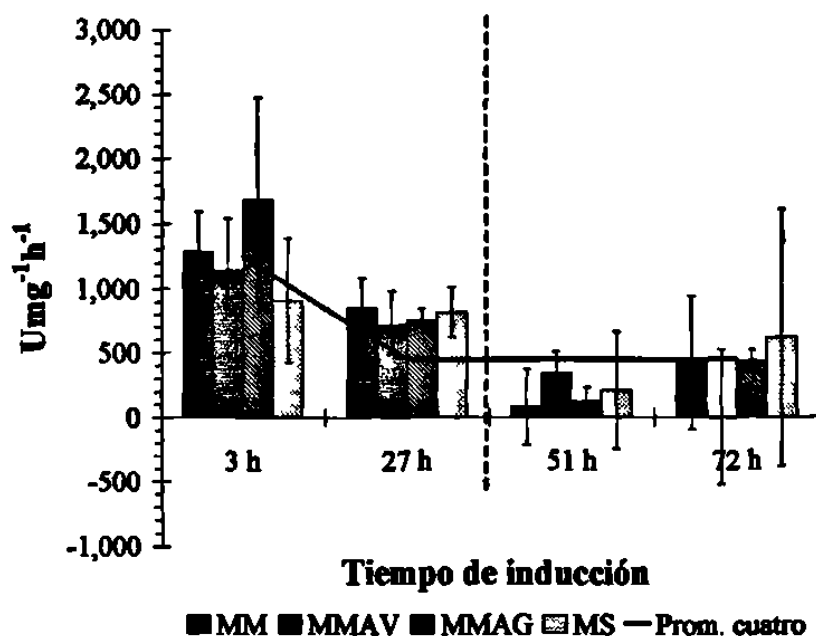


Figura 18. Velocidad aparente de síntesis de  $\beta$ -galactosidasa bajo condiciones de inducción. Cada barra representa a un medio de cultivo y la altura representa el valor promedio  $\pm$  una desviación estándar. La curva representa el promedio de la velocidad aparente de síntesis de  $\beta$ -galactosidasa vs tiempo de los medios mínimos de cultivo y del medio con sales. La línea punteada indica la separación de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento.

### 3.4.3 Evaluación y comparación de la actividad enzimática de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa

#### 3.4.3.1 Alcohol oxidasa

La concentración total de AOX biológicamente activa en el medio de cultivo aumentó a través del tiempo de inducción en los cuatro medios de cultivo durante la fase exponencial. En los medios mínimos, se alcanzó el valor máximo de actividad de AOX a las 27 h de inducción y permaneció constante hasta las 51 h, mostrando una disminución después de este tiempo de inducción. En el medio con sales el valor máximo de actividad se observó a las 51 h y también mostró una disminución en la actividad de

AOX a partir de este tiempo de inducción (Figura 19). Las concentraciones de AOX en los medios mínimo y mínimo suplementados no mostraron diferencias significativas en los tiempos de inducción evaluados, sin embargo en el medio con sales se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a los otros medios, mostrando niveles menores de esta enzima durante la fase exponencial e igualándose con ellos en la fase estacionaria de crecimiento. La actividad de la enzima es un reflejo directo de la cantidad de producto acumulado, la cual también fue aumentando con respecto al tiempo durante la fase exponencial, pero mostró una disminución en la fase estacionaria.

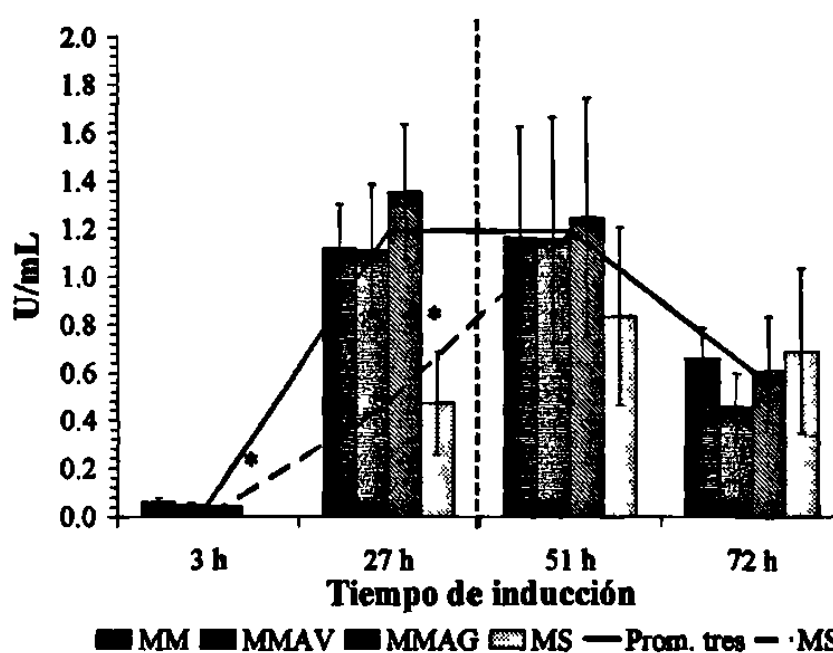


Figura 19. Actividad enzimática de AOX en el medio de cultivo durante el proceso de inducción en los cuatro medios de cultivo estudiados. Cada barra representa a un medio de cultivo y la altura representa el valor promedio  $\pm$  una desviación estándar. Las curvas representan el promedio de la actividad enzimática de AOX vs tiempo de los medios mínimos (—) y la equivalente para el medio con sales (---). La línea punteada vertical indica la separación de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. Se encontraron diferencias significativas en el medio con sales a las 3 y 27 h (\*) con una  $p < 0.05$ ;  $n = 9$ ,  $C.V._{EEM} < 16\%$ .

La actividad específica de la AOX a las 3 h de inducción mostró diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) con valores menores en el medio con sales respecto a los otros medios que no mostraron diferencias significativas entre sí. A este tiempo de inducción la actividad específica de AOX en este medio fue mínima (Figura 20), sin embargo a partir de las 51 h de inducción, los niveles de AOX en el medio con sales se igualaron a los niveles observados en los medios mínimos, no encontrándose diferencias significativas entre los cuatro medios estudiados. La actividad específica de AOX mostró un incremento durante la fase exponencial y un decremento durante la fase estacionaria de crecimiento en los cuatro medios de cultivo.

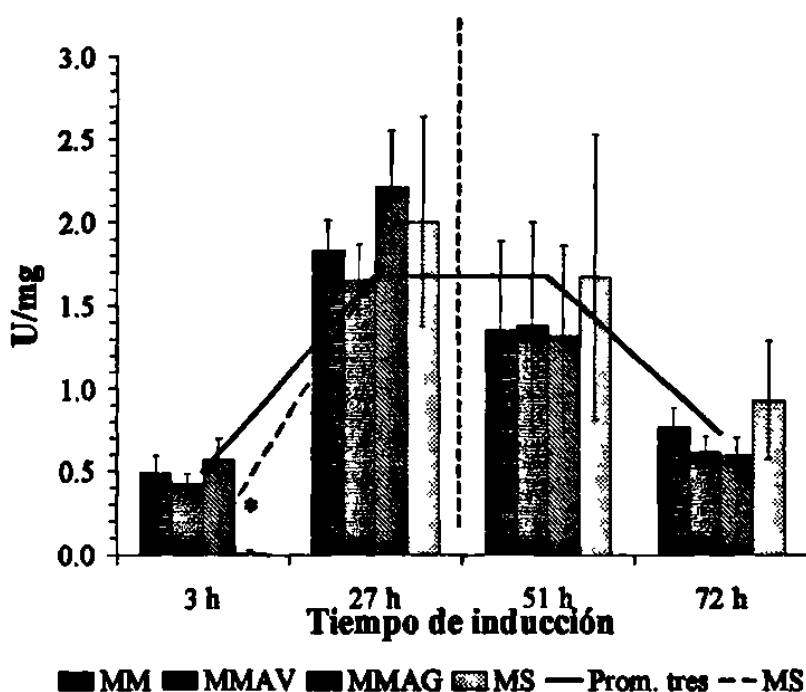


Figura 20. Actividad específica de AOX en *P. pastoris* GS115  $\beta$ -galactosidasa en los medios de cultivo evaluados bajo condiciones de inducción. Cada barra representa a un medio de cultivo y la altura representa el valor promedio  $\pm$  una desviación estándar. Las curvas representan el promedio de la actividad específica de AOX vs tiempo de los medios mínimos (—) y la equivalente para el medio con sales (---). La línea punteada vertical indica la separación de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. Se encontraron diferencias significativas en el medio con sales a las 3 h (\*) con una  $p < 0.01$ ,  $n = 9$ , C.V.<sub>BEM</sub> <17%.

De igual forma que la actividad específica de AOX, en la velocidad aparente de síntesis de esta enzima se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) a las 3 h de inducción en el medio con sales respecto a los otros medios estudiados que no mostraron diferencias significativas entre sí, registrándose valores menores de velocidad en el medio con sales en este tiempo de inducción. En los medios mínimos la velocidad aparente de síntesis de esta enzima (Figura 21) disminuyó considerablemente durante el cultivo en metanol llegando incluso a alcanzar valores negativos. Este comportamiento fue similar en el medio con sales, excepto durante la fase exponencial de crecimiento en la cual se observó un aumento en la velocidad aparente de síntesis, sin embargo durante la fase estacionaria disminuyó de igual manera que en los medios mínimos.

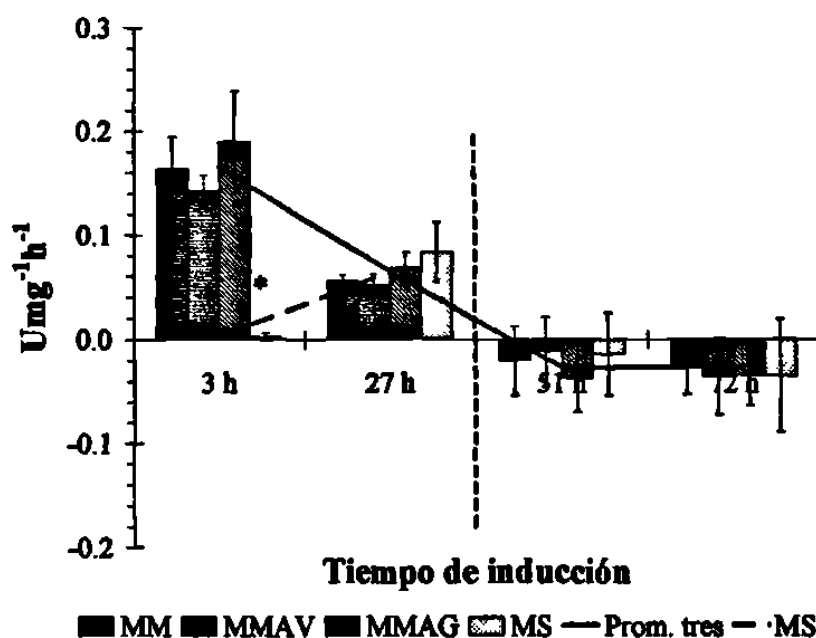


Figura 21. Velocidad aparente de síntesis de AOX en los cuatro medios de cultivo bajo condiciones de inducción. Cada barra representa a un medio de cultivo y la altura representa el valor promedio  $\pm$  una desviación estándar. Las curvas representan el promedio de la velocidad aparente de síntesis de AOX vs tiempo de los medios mínimos (—) y la equivalente para el medio con sales (---). La línea punteada vertical indica la separación de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. Se encontraron diferencias significativas en el medio con sales a las 3 h (\*) con una  $p < 0.01$

### 3.4.3.2 Catalasa

La actividad enzimática de catalasa en el medio de cultivo aumentó con respecto al tiempo del cultivo en metanol durante la fase exponencial de crecimiento y tendió a permanecer constante en la fase estacionaria de crecimiento (Figura 22). Este comportamiento se observó igual en los cuatro medios de cultivo estudiados. Al comparar los medios, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a las 3 y 27 h de inducción, observándose valores de concentración mayores en el medio mínimo a las 3 h y valores menores en el medio con sales a las 27 h de inducción igualándose la actividad de catalasa de estos medios a los otros durante la fase estacionaria.

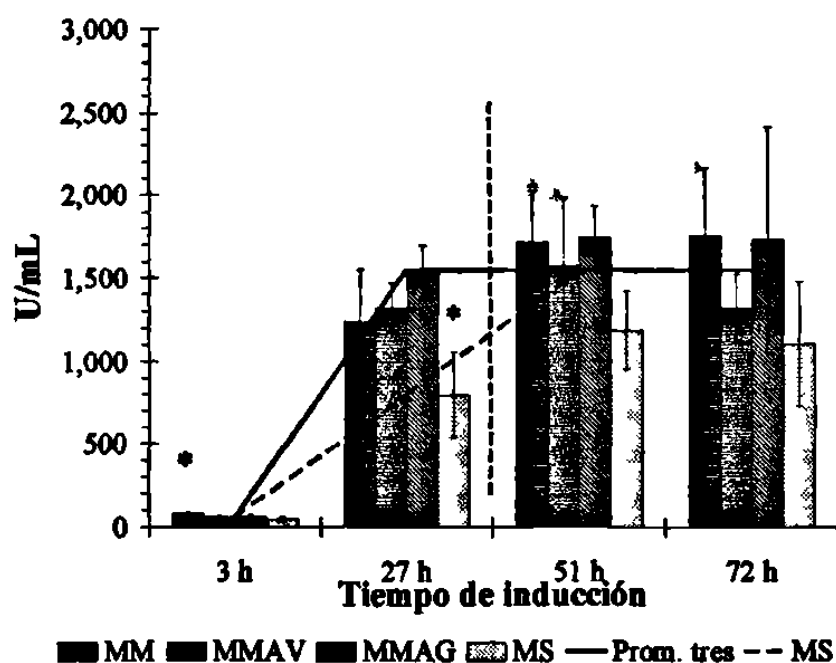


Figura 22. Actividad enzimática de catalasa en el medio de cultivo durante el proceso de inducción en los cuatro medios de cultivo estudiados. Cada barra representa a un medio de cultivo y la altura representa el valor promedio  $\pm$  una desviación estándar. Las curvas representan el promedio de la actividad enzimática de catalasa vs tiempo de los medios mínimos (—) y la equivalente para el medio con sales (---). La línea punteada vertical indica la separación de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. Se encontraron diferencias significativas en el medio mínimo a las 3 h y en el medio con sales a las 27 h (\*) con una  $p < 0.05$ ;  $n = 9$ ,  $C.V_{BEM} < 13\%$ .

La actividad específica de catalasa mostró un incremento con respecto al tiempo de inducción durante la fase exponencial de crecimiento y una disminución durante la fase estacionaria de crecimiento, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en el medio con sales a las 3 h de inducción, tiempo en el cual la actividad específica de esta enzima en este medio fue mayor (Figura 23).

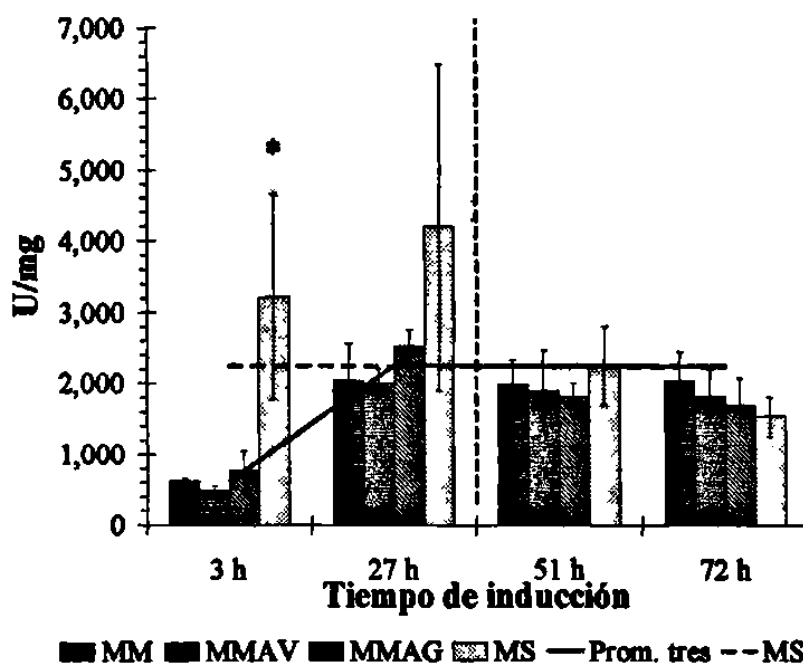


Figura 23. Actividad específica de catalasa en *P. pastoris*  $\beta$ -galactosidasa en los medios de cultivo evaluados bajo condiciones de inducción. Cada barra representa a un medio de cultivo y la altura representa el valor promedio  $\pm$  una desviación estándar. Las curvas representan el promedio de la actividad específica de catalasa vs tiempo de los medios mínimos (—) y la equivalente para el medio con sales (---). La línea punteada vertical indica la separación de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. Se encontraron diferencias significativas en el medio con sales a las 3 h (\*) con una  $p < 0.01$ ;  $n = 9$ , C.V.  $EEM < 15\%$ .

La velocidad aparente de síntesis de esta enzima mostró una marcada disminución en la fase exponencial de crecimiento y tendió a permanecer constante en la fase estacionaria, este comportamiento se observó en los cuatro medios de cultivo (Figura 24). Al comparar la velocidad aparente de síntesis en los cuatro medios de cultivo se

encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) a las 3 h de inducción, siendo nuevamente el medio con sales el que resultó ser diferente, mostrando un valor mayor a las 3 h de inducción con respecto a los otros tres medios evaluados que no mostraron diferencias significativas entre sí.

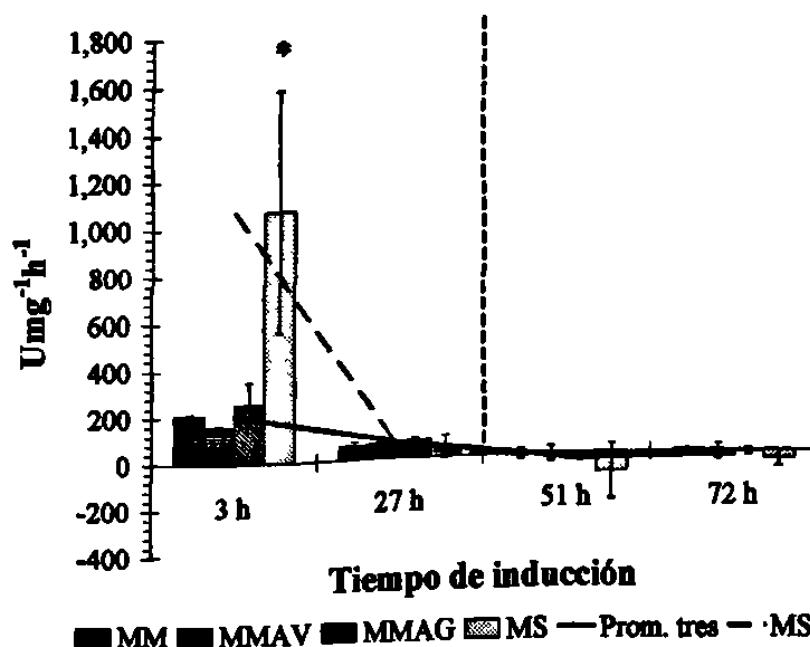


Figura 24. Velocidad aparente de síntesis de catalasa en los cuatro medios de cultivo bajo condiciones de inducción. Cada barra representa a un medio de cultivo y la altura representa el valor promedio  $\pm$  una desviación estándar. Las curvas representan el promedio de la velocidad aparente de síntesis de catalasa vs tiempo de los medios mínimos (—) y la equivalente para el medio con sales (---). La línea punteada vertical indica la separación de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. Se encontraron diferencias significativas en el medio con sales a las 3 y 27 h (\*) con una  $p < 0.01$ .

#### 3.4.4 Comparación de las proteínas intracelulares solubles

La concentración de proteínas intracelulares en el medio de cultivo mostró un incremento con respecto al tiempo de inducción en los cuatro medios de cultivo durante la fase exponencial de crecimiento (Figura 25), sin embargo en la fase estacionaria la concentración de proteína intracelular soluble tendió a permanecer constante en los



medios mínimos mientras que en el medio con sales siguió aumentando. El comportamiento observado en la fase exponencial de crecimiento ocurrió en menor grado en el medio con sales el cual mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a las 3, 27 y 51 h de inducción con respecto a los otros medios. La concentración de proteína intracelular en el medio con sales a estos tres tiempos mostró valores menores de concentración de proteínas que los otros tres medios que no mostraron diferencias significativas entre sí, alcanzando a las 72 h de inducción los niveles proteicos observados en los medios mínimos.

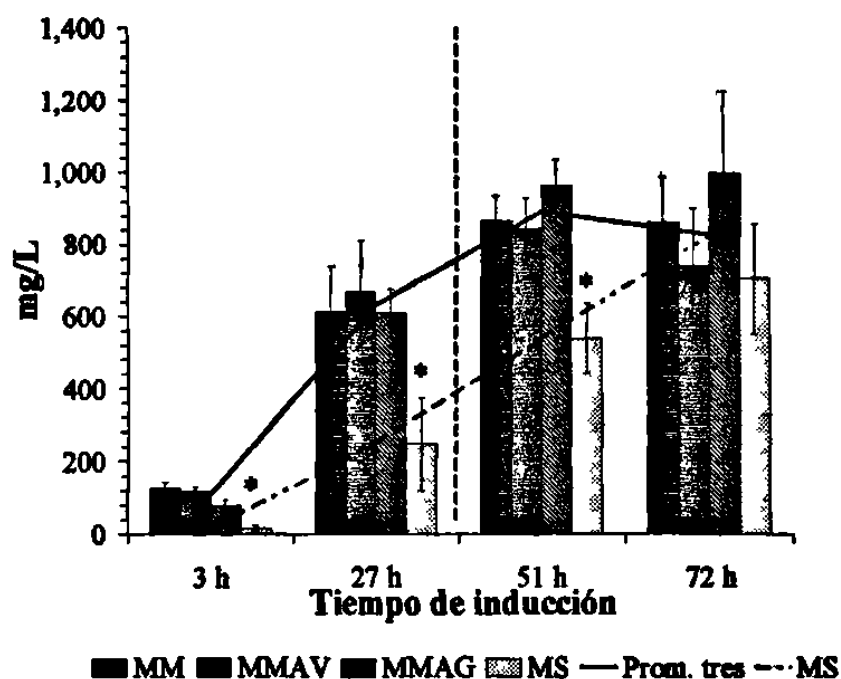
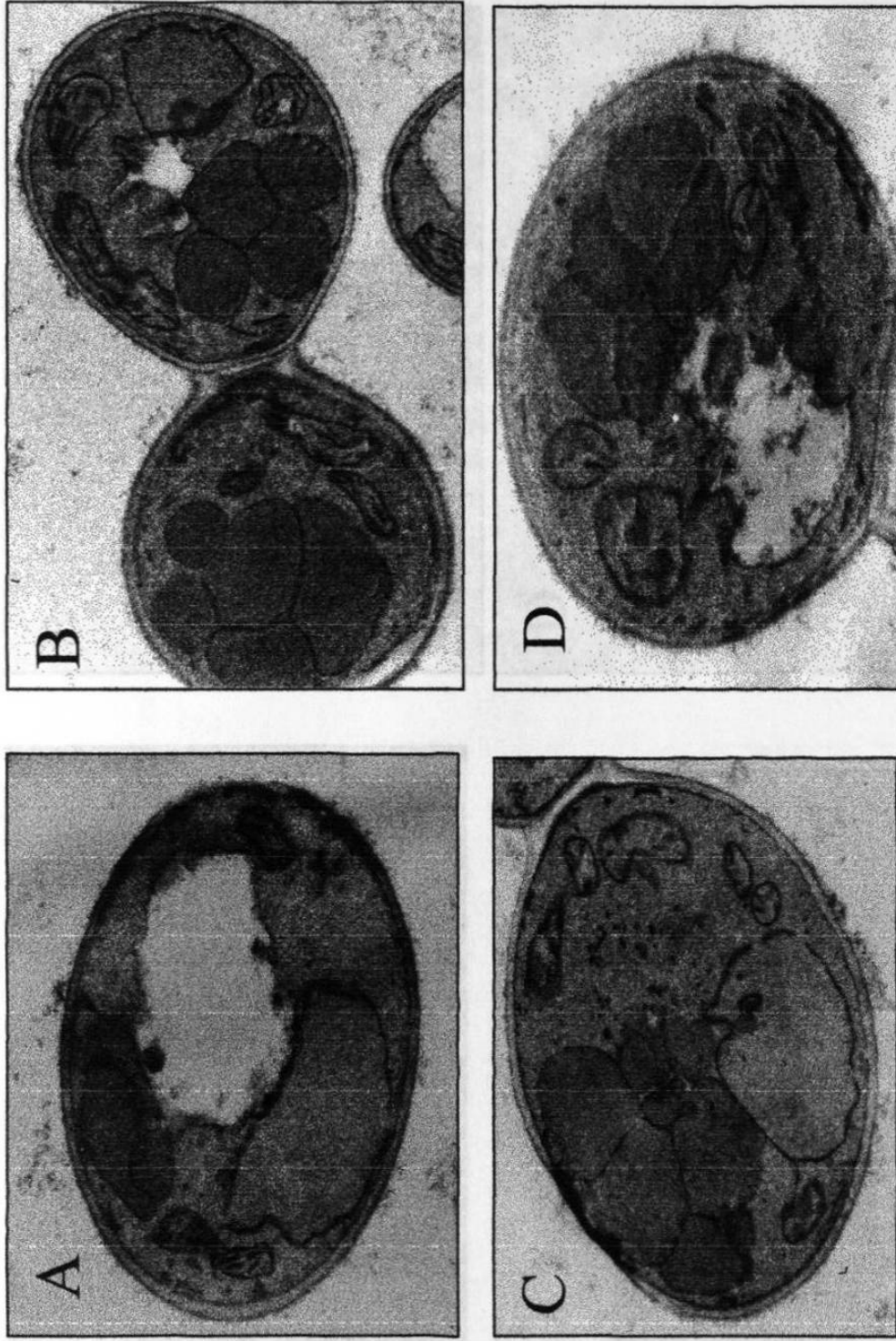


Figura 25. Concentración de proteína intracelular en el medio de cultivo en los medios de cultivo estudiados bajo condiciones de inducción. Cada barra representa a un medio de cultivo y la altura representa el valor promedio  $\pm$  una desviación estándar. Las curvas representan el promedio de la concentración de proteína vs tiempo de los medios mínimos (—) y la equivalente para el medio con sales (---). La línea punteada vertical indica la separación de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. Se encontraron diferencias significativas en el medio con sales a las 3, 27 y 51 h (\*) con una  $p < 0.05$ ;  $n = 6$ , C.V.<sub>EEM</sub> < 15%.

#### 3.4.5 Evaluación y comparación de la proliferación peroxisomal

La morfología de la levadura *P. pastoris*  $\beta$ -galactosidasa en el medio MM, el cual es representativo de los medios MMAV y MMAG, se muestra en la Figura 26. En esta figura se puede observar que a las 3 h de inducción las células mostraron un citoplasma homogéneo, vacuola, núcleo, mitocondrias y peroxisomas bien definidos, siendo estos últimos pequeños en tamaño y en número, ocupando menor área citoplásmica comparada a aquella ocupada por peroxisomas de tiempos de inducción mayores. A las 27 h de inducción también se observó un citoplasma homogéneo y organelos bien delimitados, sin embargo los peroxisomas mostraron un incremento visible en número y tamaño llegando a ocupar una área citoplásmica mayor que a las 3 h de inducción. A las 51 y 72 h de inducción la morfología de la célula fue similar a la observada a las 27 h, sin observarse un cambio notorio en los peroxisomas en cuanto a tamaño, volumen y área citoplásmica ocupada con respecto al tiempo de inducción.

En el medio con sales, la morfología de la célula (Figura 27) a las 3 h de inducción fue muy diferente a la observada en los otros medios de cultivo estudiados, la célula presentó un citoplasma electrodense en el cual fue difícil distinguir los organelos. Sin embargo, a las 27 h de inducción la morfología de la célula ya fue más parecida a la observada en los otros medios, fue posible distinguir la ultraestructura celular observándose un citoplasma homogéneo y organelos definidos, los peroxisomas se observaron bien definidos, sin embargo se observaron más pequeños ocupando un área citoplásmica menor comparados con los de los medios mínimos al mismo tiempo de evaluación. A las 51 y 72 h de inducción la morfología celular fue similar a la observada en los otros medios de cultivo observándose un ligero incremento en el volumen de los peroxisomas con respecto a los de las 27 h de inducción.



**Figura 26. Micrografías electrónicas de *P. pastoris* GS115 B-galactosidasa cultivada en medio mínimo con metanol como fuente de carbono: A) 3 h de inducción, B) 27 h de inducción, C) 51 h de inducción, D) 72 h de inducción. 12000 X**

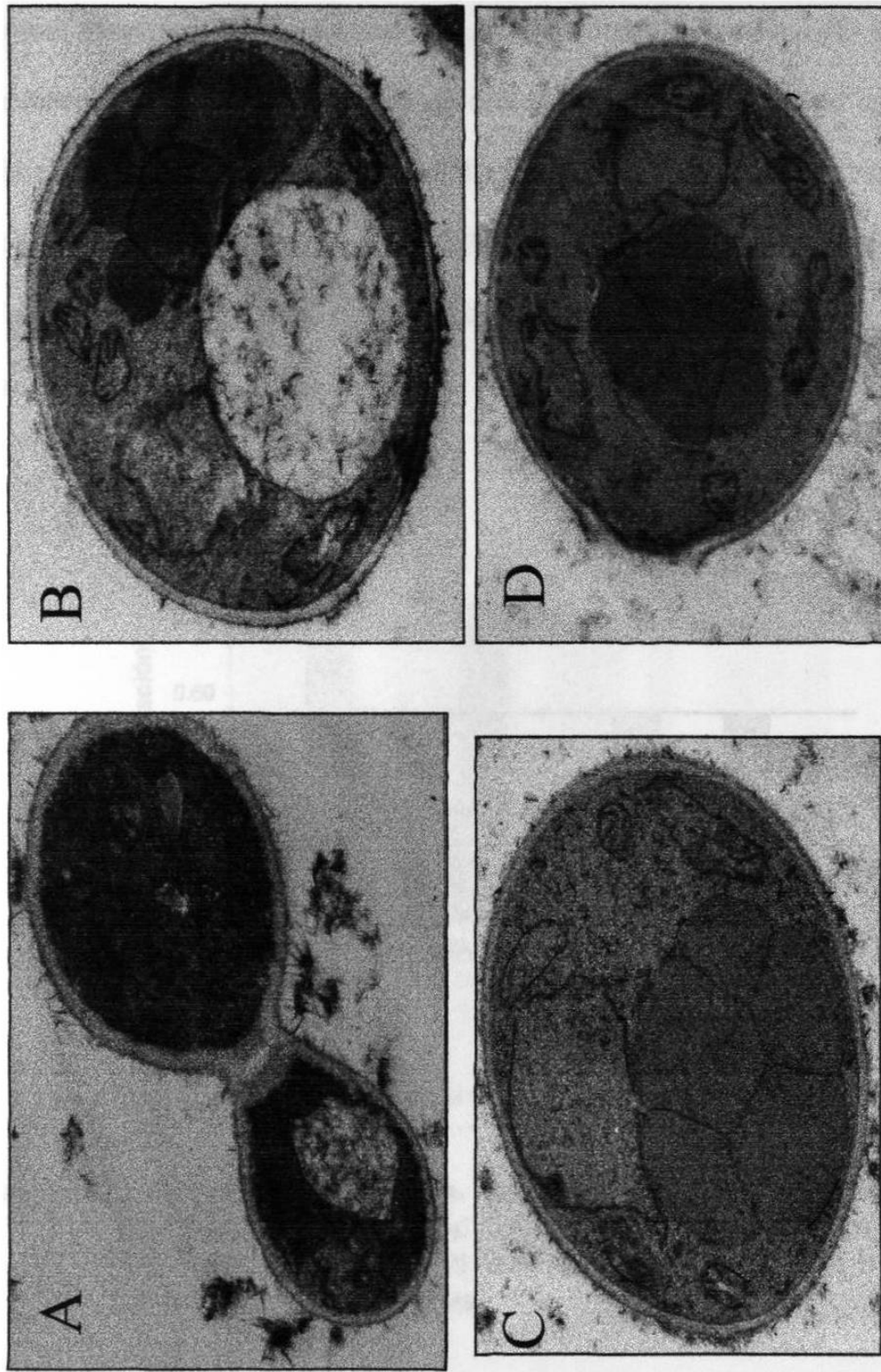


Figura 27. Micrografías electrónicas de *P. pastoris* GS115  $\beta$ -galactosidasa crecida en medio con sales con metanol como fuente de carbono: A) 3 h de inducción, B) 27 h de inducción, C) 51 h de inducción, D) 72 h de inducción. 12000 X

### 3.5 Correlación de los cambios bioquímicos y celulares con la producción de $\beta$ -galactosidasa

En la Figura 28 se presentan los coeficientes de correlación lineal entre la actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa y la actividad específica de las enzimas peroxisomales, existiendo correlación de esta proteína con la actividad específica de catalasa en los medios MM ( $r=0.72$ ,  $p<0.05$ ) y MMAV ( $r=0.83$ ,  $p<0.05$ ). No se observó correlación de la actividad específica de la  $\beta$ -galactosidasa con la actividad específica de catalasa en los otros medios de cultivo ni con la actividad específica de AOX en ninguno de los cuatro medios de cultivo.

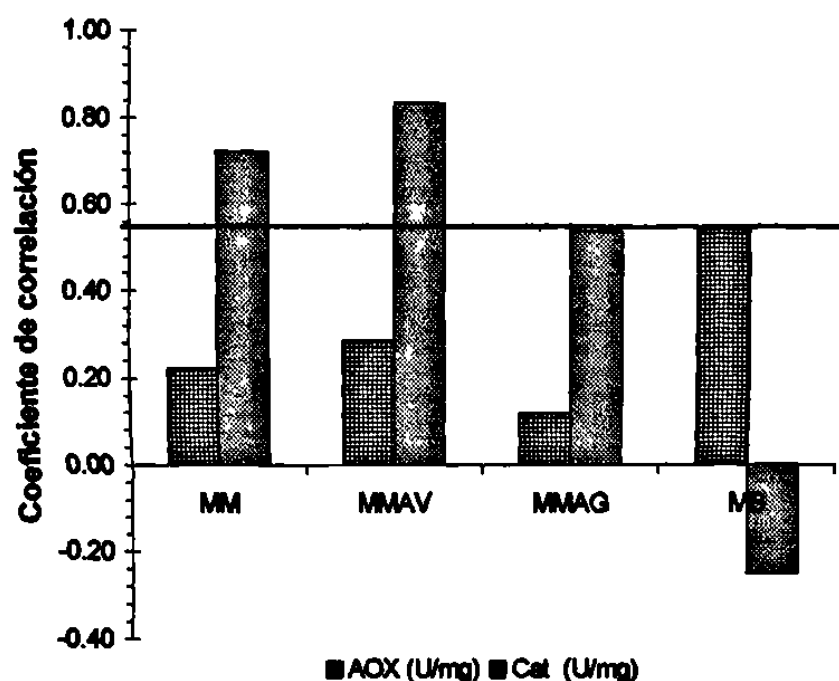


Figura 28. Coeficientes de correlación lineal de la actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa con la actividad específica de las enzimas peroxisomales. La línea horizontal representa el valor crítico de  $r$  (0.57) para 10 grados de libertad y  $\alpha = 0.05$  de dos colas (37).

Al determinar la correlación lineal de la concentración de  $\beta$ -galactosidasa en el cultivo con el crecimiento celular, con la concentración de proteínas en el cultivo y la actividad de las enzimas peroxisomales se encontró correlación de la  $\beta$ -galactosidasa con todos los parámetros con los que se comparó en todos los medios de cultivo ( $r > 0.75$ ,  $p < 0.05$ ) excepto con la actividad de AOX con la cual no mostró correlación en los medios MM, MMAV y MMAG, pero si hubo correlación con esta enzima peroxisomal en el medio con sales ( $r = 0.69$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 29).

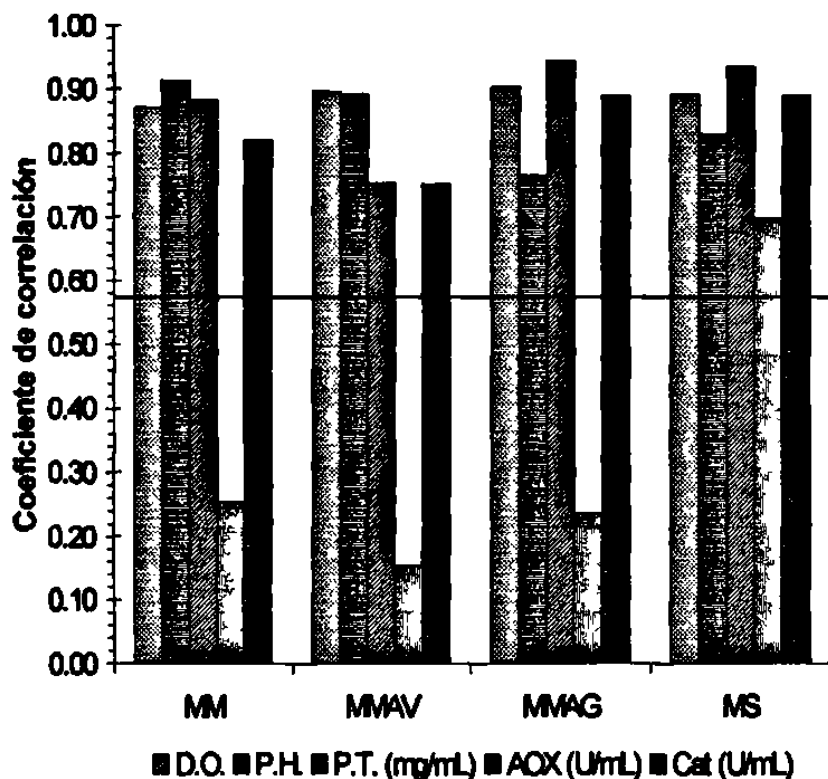


Figura 29. Coeficientes de correlación lineal de la actividad enzimática de  $\beta$ -galactosidasa en el cultivo con las actividades enzimáticas de AOX y catalasa, con el crecimiento celular y con la concentración de proteínas intracelulares solubles. La línea horizontal representa el valor crítico de  $r$  (0.5) para 10 grados de libertad y  $\alpha = 0.05$  de dos colas (17).

## **CAPITULO 4**

### **DISCUSION**

Las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio son las más empleadas en fermentaciones de *P. pastoris* para la producción de proteínas recombinantes (25) y también son las que previamente se habían optimado en los laboratorios en los que se realizó este estudio (7, 9). Respecto a la composición de los medios de cultivo, se seleccionó también la más utilizada (25) y la que se ha observado que tiene una influencia positiva en la producción de proteínas recombinantes, como es el caso de la adición de ácidos grasos, vitaminas, aminoácidos y minerales al medio de cultivo (16, 20, 25).

En la estandarización de los métodos empleados, se obtuvieron coeficientes de variación dentro de los límites aceptables para cada método.

Respecto a la determinación de la actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa y de las actividades enzimáticas de AOX y catalasa, el valor promedio obtenido de actividad de la solución estándar utilizada en cada método fue menor al esperado. La actividad específica disminuida de las enzimas se debió probablemente a una pérdida de actividad durante el transporte de estas enzimas desde la casa comercial al laboratorio. Los coeficientes de correlación lineal obtenidos en la determinación de la actividad de AOX y catalasa indican que se trabajó en la zona de respuesta lineal de la reacción.

En la estandarización del método de lisis celular y evaluación del número de lavados realizados a las perlas de vidrio, se logró extraer la mayor cantidad de proteína intracelular soluble al efectuar cinco lavados a las perlas de vidrio, lo que se corroboró con la medición de la actividad enzimática de catalasa.

Con el método de procesamiento de levaduras para microscopía electrónica empleado se conservó la ultraestructura de la célula de la levadura *P. pastoris* lográndose observar los organelos bien definidos.

En cuanto al crecimiento celular, se lograron apreciar las fases exponencial y estacionaria de crecimiento, sin embargo la fase lag no fue observada debido a que el inóculo de los medios de cultivo provenía de un cultivo en la fase exponencial, así mismo, también se observó que el crecimiento celular no fue afectado de forma diferente por la composición de los medios de cultivo. El tiempo de generación promedio de la levadura en metanol obtenido en este estudio (11 h) fue mayor al reportado en la literatura (4-6 h) (13) debido a la ausencia de mediciones a intervalos cortos durante el tiempo de fermentación evaluado (0-27 h de inducción).

Respecto a la actividad específica, equivalente a la concentración celular, de  $\beta$ -galactosidasa y de las dos enzimas peroxisomales en todos los medios, se observó un comportamiento dependiente de la fase de crecimiento observando que en todos los casos se incrementa la actividad durante la fase exponencial.

Los resultados muestran que ya a las 3 h de inducción con metanol, la maquinaria transcripcional y traduccional de AOX está operando sin diferencia significativa entre los medios mínimos a diferencia del medio con sales, el cual se iguala a las 27 h con los otros medios de cultivo. Estos resultados están en concordancia con las observaciones sobre la proliferación peroxisomal, ya que a las 3 h en los medios mínimos se observa



un incremento en volumen y número en los peroxisomas y no así en el medio con sales en el cual a este tiempo de inducción estos organelos fueron difíciles de observar y los que pudieron observarse eran pocos y pequeños. La deficiente proliferación peroxisomal en el medio con sales podría ser la causa de la actividad disminuida de AOX a este tiempo ya que esta enzima es activa sólo en la matriz peroxisomal (31-33), o tal vez estos resultados se deben a un metabolismo proteico disminuido en el medio con sales durante el inicio de la fase exponencial. Este metabolismo proteico disminuido fue corroborado con los niveles bajos de proteínas intracelulares y con la morfología observada en estas células en la fase de crecimiento exponencial.

Respecto a la actividad específica de catalasa, se observó diferencia significativa en el medio con sales durante la fase exponencial, observándose mayor actividad de catalasa en este medio con respecto a los otros medios. Esto puede ser debido a una inducción de otras peroxidases que puedan ser citosólicas o mitocondriales en respuesta a la composición del medio con sales, ya que se ha reportado en la literatura que en levaduras puede haber otros mecanismos involucrados en la degradación del  $H_2O_2$  (12).

El descenso evidente de la actividad específica de la enzima peroxisomal AOX a partir de las 27 h de inducción en todos los medios de cultivo, mas no así de la  $\beta$ -galactosidasa, conduce a pensar en una desactivación de esta enzima, lo cual está en concordancia con lo reportado por otros autores que justifican esta disminución con varias causas, entre ellas la formación de peroxisomas completamente cristalinos durante la fase estacionaria. Esta estructura es debida a la AOX la cual en forma cristalina es menos activa que en su forma soluble (33). Otra razón puede ser que exista un efecto tóxico del metanol. A pesar de la disminución de la actividad específica de AOX, la actividad específica de la  $\beta$ -galactosidasa permanece constante durante la fase

estacionaria, debido probablemente a que su síntesis no disminuye o a que es una enzima más estable.

En la cantidad acumulada de las enzimas peroxisomales medida a través de la actividad enzimática o concentración en el cultivo, se vio un aumento evidente de éstas en la fase exponencial. En el caso de AOX, se observó una disminución pronunciada después de las 27 h debido probablemente a una desactivación o degradación de esta enzima.

Es evidente la diferencia del perfil de las concentraciones de AOX a lo largo del cultivo con el de la  $\beta$ -galactosidasa en los medios mínimos, sin embargo, el medio con sales mostró diferencia significativa en este parámetro durante la fase exponencial con respecto a los otros medios y se cree que esta diferencia se debe fundamentalmente a una disminución de la síntesis proteica total en el medio con sales, la cual afecta a la síntesis de AOX. Esto está en concordancia con la concentración de proteínas totales en la cual se observaron diferencias significativas durante la fase exponencial en el medio con sales con respecto a los otros medios de cultivo.

La disminución a lo largo del cultivo de las velocidades aparentes de biosíntesis de las enzimas peroxisomales está en concordancia con datos de la literatura donde se describe que la síntesis de AOX disminuye considerablemente en la fase estacionaria (30), sin embargo para  $\beta$ -galactosidasa, la velocidad aparente de biosíntesis se mantiene constante a lo largo del cultivo, lo que indica un equilibrio entre la síntesis y la degradación de esta proteína recombinante.

Ya que la  $\beta$ -galactosidasa y AOX están regidas por el mismo promotor, se esperarían comportamientos similares respecto a la síntesis de ambas proteínas, sin

embargo esto no es así tal como lo indican las evaluaciones estadísticas de correlación que muestran una ausencia de correlación entre las actividades específicas de estas dos enzimas a lo largo del cultivo. Esta ausencia de correlación también se observó en la cantidad acumulada de  $\beta$ -galactosidasa por litro de cultivo, excepto para el medio con sales en el cual la concentración de AOX y  $\beta$ -galactosidasa en el cultivo siguió aumentando de forma similar hasta las 51 h de inducción, sin embargo en los medios mínimos la actividad de AOX solo aumentó hasta las 27 h.

Con los resultados obtenidos indican que la composición de los medios de cultivo mínimos afectó de la misma manera el metabolismo de la célula, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros evaluados. Sin embargo, la composición del medio con sales afectó de manera diferente el metabolismo celular, el cual se observó desfasado durante la fase exponencial con respecto a los medios mínimos. Las diferencias observadas en el metabolismo de la célula en este medio pueden ser debidas a una disminución de la síntesis proteica causada probablemente por un daño inicial a la célula producido por la composición de este medio. Este daño fue corroborado con las observaciones de la ultraestructura celular.

El metabolismo de AOX (enzima importante para el crecimiento de *P. pastoris* en metanol como única fuente de carbono y energía) y de  $\beta$ -galactosidasa (proteína recombinante cuya expresión es regulada por el promotor de *AOX1*) fue diferente y dependiente de la fase de crecimiento. Las diferencias en el comportamiento metabólico de AOX y  $\beta$ -galactosidasa podrían justificarse por diferencias en los procesos de: transcripción (estabilidad de los ARNm), traducción, degradación o estabilidad del producto proteico. Estas diferencias son importantes y se deben tomar en cuenta en los procedimientos de fermentación para obtener procesos fermentativos más eficientes.

Los resultados obtenidos sugieren que con el modelo estudiado, todos los medios conducirán a mayores productividades volumétricas manteniendo el cultivo en la fase exponencial, debido a que en esta fase se obtuvieron las velocidades aparentes de síntesis máximas de AOX y  $\beta$ -galactosidasa.

En el modelo estudiado los mayores niveles de producción se obtuvieron durante la fase estacionaria en todos los medios de cultivo, esto es debido a que el producto recombinante es estable y se acumula en el cultivo. Sin embargo, el cultivo no debe prolongarse por tiempos largos durante la fase estacionaria debido a la desactivación o degradación de AOX durante esta fase de crecimiento lo que conduciría a la lisis y muerte celular.

## **CAPITULO 5**

### **CONCLUSIONES**

La composición del medio mínimo y los medios mínimos suplementados con aminoácidos, vitaminas y ácido palmítico no mostraron diferencias entre sí en los parámetros empleados para evaluar los procesos bioquímicos y celulares en estudio, indicando que el medio mínimo contiene los requerimientos nutritivos equivalentes que conducen a los mismos resultados con el modelo estudiado.

Las diferencias observadas en los procesos bioquímicos y celulares en el cultivo del medio con sales respecto a los otros medios estudiados y las cuales fueron dependientes de la fase de crecimiento, pueden ser debidas a una disminución en la biosíntesis de las proteínas celulares causada por un daño inicial al cultivo por la composición de este medio.

Una biosíntesis de proteínas disminuida puede ser la causa de niveles más bajos de producción de la proteína recombinante en estudio durante la fase exponencial en los cultivos con el medio con sales.

El comportamiento metabólico de las enzimas peroxisomales en las diferentes fases de crecimiento de todos los medios de cultivo evaluados fue diferente al comportamiento metabólico de la proteína recombinante estudiada y estas diferencias fueron dependientes de la fase de crecimiento del cultivo.

La proliferación de peroxisomas fue paralela al aumento de la actividad de AOX en todos los medios estudiados.

El comportamiento metabólico de AOX fue diferente al de  $\beta$ -galactosidasa, a pesar de que la expresión de ambos genes está regulada por el mismo promotor.

Las diferencias en el comportamiento metabólico de AOX y  $\beta$ -galactosidasa podrían justificarse por diferencias en los procesos de: transcripción (estabilidad de los ARNm), traducción, degradación o estabilidad del producto proteico.

Los resultados obtenidos sugieren que con el modelo estudiado, todos los medios conducirán a mayores productividades volumétricas manteniendo el cultivo en la fase exponencial.

En el modelo estudiado los mayores niveles de producción se obtienen durante la fase estacionaria en todos los medios de cultivo, esto es debido a que el producto recombinante es estable y se acumula en el cultivo.

El cultivo no debe prolongarse por tiempos largos durante la fase estacionaria debido a la desactivación o degradación de AOX durante esta fase de crecimiento lo que conduciría a la lisis y muerte celular.

Los parámetros empleados para evaluar los diferentes procesos bioquímicos permitieron establecer estrategias fundamentadas en la selección de las condiciones de cultivo apropiadas para optimar la producción de las proteínas heterólogas empleando el sistema de *Pichia pastoris*.

## **CAPITULO 6**

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
2. Bradford, M.A. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72.
3. Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C. (1993). Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 11(8): 905-910.
4. Eckart, M., Bussineau, C. (1996). Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 525-530.
5. Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M., Gingeras, T.R. (1985). Isolation of Alcohol Oxidase and Two Other Methanol Regulatable Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 5 (5): 1111-1121.
6. Erdmann, R., Wiebel, F., Flessau, A, Rytka, J., Beyer, A., Fröhlich, K., Kunau, W. (1991). PAS1, a Yeast Gene Required for Peroxisome Biogenesis, Encodes a Member of a Novel Family of Putative ATPases. *Cell* 64: 499-510.
7. Escamilla-Treviño, L.L., Viader-Salvadó, J.M., Barrera-Saldaña, H.A., Guerrero-Olazarán, M. (2000). Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Let.* 22(2): 109-114.

8. Escamilla, L.L., Viader, J.M., Guerrero, M. (1999). Producción de proteínas recombinantes en *P. Pastoris*. *Ciencia UANL*, II, 2: 155-161.
9. Escamilla, L.L. (1996). Biosíntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, U.A.N.L
10. Faber, K., Harder, W., AB, G., Veenhuis, M. (1995). Review: Methylophilic Yeasts as Factories for the Production of Foreign Proteins. *Yeast* 11: 1331-1344.
11. Faber, K.N., Elgersma, Y., Heyman, J.A., Koller, A., Lüers, G.H., Nuttley, W.M., Terlecky, S.R., Wenzel, T.J., Subramani, S. Use of *Pichia pastoris* as a Model Eukaryotic System, Peroxisome Biogenesis en *Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols*. Higgins and Cregg (ed). Humana Press Inc.
12. Gould, S., McCollum, D., Spong, A.P., Heyman, J.A., Subramani, S. (1992). Development of the Yeast *Pichia pastoris* as a Model Organism for a Genetic and Molecular Analysis of Peroxisome Assembly. *Yeast* 8:613-628.
13. Invitrogen Corporation (San Diego CA, EUA) *Pichia* Expression Kit. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*, Version 3.0.
14. Janssen, F.W., Ruelius, H.W. (1968). Alcohol oxidase, a flavoprotein from several Basidiomycetes species. Crystallization by fractional precipitation with polyethylene glycol. *Biochim. Biophys Acta* 151: 330-342.
15. Keesey, J. (1987). *Biochemica Information*, Boehringer Mannheim Biochemicals Indianapolis, IN. 1<sup>st</sup> ed.



16. Kobayashi, K., Kuwae ,S., Ooya, T., Fukutsuka, H., Sumi, A., Ohtani, W., Ohmura, T., Yokoyama, K. (1994). Fatty Acid Supplemented Medium for Recombinant Production of Human Serum Albumin by Yeast. United States Patent. Patent 5,334,512
17. Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York.
18. Pardell, H., Cobo, E., Canela, J. (1986). Medidas de Tendencia Central y de Variabilidad. Manual de Bioestadística. Ed. Masson. pp 25-36.
19. Pelczar, Reid, Chan (1982).Reproducción y Desarrollo en Microbiología, Ed. Mc Graw Hill, Segunda Edición, pp. 102-116.
20. Prevatt, W.D., Sreekrishna, K. (1994). Expression of Human Serum Albumin in *Pichia pastoris*. United States Patent. Patent 5,330,901.
21. Romanos, M. (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. Curr. Opin. Biotechnol. 6:527-533
22. Saito, T., Kato, K., et al (1992) Overproduction of thermoestable  $\beta$ -galactosidase in *Escherichia coli*, its purification and molecular structure. J. Ferment. Bioeng.74(1):12-16.
23. Scopes, R. K. (1988). Solutions for Measuring Protein Concentration en Protein Purification. Principles and Practice. Springer-Verlag, New York Inc. Second Edition pp 305-306.

24. Sreekrishna, K., Brankamp, R., Kropp, K., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A., Birkenberger, L.A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190(1): 55-62.
25. Sreekrishna, K., Kropp, K. (1996). Non conventional Yeasts in Biotechnology en *Pichia pastoris*. Wolf (ed.) A Handbook, Springer, pp. 203-251.
26. 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.
27. Sreekrishna, K., Potenz, R., Cruze, J., McCombie, W., Parker, K., Nelles, L., Mazzaferro, P., Holden, K. Harrison, R., Wood, P. Phelps, D., Hubbard, C., Fuke, M. (1988). High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Basic Microbiol.* 28(4): 265-278.
28. Sudbery, P. (1996). The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:517-524.
29. Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A., Gingeras, T.R. (1987). Expression of the LacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* 15, 9:3859-3876.
30. Tuttle, D.L., Lewin, A.S., Dunn, W.A. (1993). Selective autophagy of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *Eur. J. Cell Biol.* 60:283-290.
31. van der Klei, I.J., Harder, W., Veenhuis, M. (1991). Biosynthesis and Assembly of Alcohol Oxidase, A Peroxisomal Matrix Protein in Methylotrophic Yeasts: A Review. *Yeast* 7: 195-209.

32. van Dijken, J.P. (1982) Peroxisomes of methanol-grown yeasts. *Annals New York Academy of Sciences* pp. 200-216.
33. Veenhuis, M., van Dijken, J.P., Pilon, S.A., Harder, W. (1978). Development of Crystalline Peroxisomes in Methanol-Grown Cells of the Yeast *Hansenula polymorpha* and Its Relation to Environmental Conditions. *Arch. Microbiol.* 117:153-163.
34. Veenhuis, M., Harder, W. (1987a). Metabolic significance and biogenesis of microbodies in Yeast en Peroxisomes in *Biology and Medicine*. Fahimi, H. D. and Sies, H (Eds) Springer Verlag. Berlin Heideelberg pp. 437-458.
35. Waterham, H., Cregg, J. (1997). Peroxisome Biogenesis. *BioEssays* 19(1):57-66.
36. Zar, J.H. (1974). *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Chiffs, N.S.

## **CAPITULO 7**

### **REACTIVOS**

#### *Fermentación.*

##### **10X D**

##### **Glucosa 20%**

Disolver 20 g de glucosa en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C, vida media aproximada de un año. (13)

##### **YPD**

##### **Peptona 2%, extracto de levadura 1%, dextrosa 2%**

Disolver 20g de peptona, 10 g de extracto de levadura en 900 mL de agua destilada, esterilizar en autoclave, dejar enfriar y agregar 100 mL de 10 XD. Almacenar a 4 °C, la vida media puede ser de varios meses (13).

##### **10X YNB**

##### **Nitrógeno base de levadura sin aminoácidos 13.4%**

Disolver 13.4 g de YNB en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Esta solución es estable 1 año guardada a 4°C (13).

##### **Buffer de fosfatos 1 M, pH=6.0**

Disolver 2.3 g de  $K_2HPO_4$  y 11.8 g de  $KH_2PO_4$  en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH con  $H_3PO_4$  o con KOH, esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente, vida media aproximada de un año (13).

##### **500X B**

Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración y almacenar a 4°C, vida media aproximada de un año (13).

##### **10X G**

##### **Glicerol 10%**

Mezclar 10 mL de glicerol con 90 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración o autoclave. Almacenar a 4°C (13).

##### **10X M**

##### **Metanol 7.5%**

Medir 7.5 mL de metanol y llevar a 100 mL con agua destilada. Esterilizar por filtración (13).

**Vitaminas 5000X**

Disolver 1 mg de tiamina, 1 mg de riboflavina y 2 mg de ác. nicotínico en 100 mL de agua destilada. Almacenar a 4 °C

**Acido fólico 100 µg/dL.**

Disolver 1 mg de ác. fólico en 100 mL de agua destilada, tomar 1 mL de esta solución y llevar a 10 mL con agua destilada. Almacenar a 4 °C

**Aminoácidos y vitaminas 1000X (AAVIT 1000X)**

Mezclar 300 µL de ácido fólico 100 µg/dL, 2 mL de vitaminas 5000X y 7.7 mL de agua destilada. Almacenar a 4°C

**Sales basales (BSM).**

Disolver 7.66 g de sales BSM, 0.88 g de KOH y 5.72 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% en agua destilada y llevar a 220 mL de volumen final con agua (13).

**MMG/MMM**

Mezclar 10 mL de buffer de fosfatos pH 6.0, 70 mL de agua destilada, esterilizar en autoclave, enfriar, agregar 10 mL de YNB 10 X, 200 µL de 500 XB y 10 mL de 10 XG para el MMG o 10 mL de 10 XM para el MMM. Almacenar a 4 °C, vida media de un año (13).

**MMAVG/MMAVM**

Preparar igual que para el MMG/MMM y agregar 100 µL de AAVIT 1000X.

**MMAGG/MMAGM**

Preparar igual que para el MMG/MMM, pero antes de esterilizar en autoclave agregar 0.05 g de ácido palmítico.

**MSG/MSM**

Medir 82.5 mL de BSM, ajustar a pH 5.0 con NH<sub>4</sub>OH, llevar a 100 mL con agua destilada. Hacer alicuotas de 25 mL, esterilizar en autoclave, a cada alicuota agregar: 167 µL de 500K B. 167 µL de sales PTM1 y 250 µL de glicerol para el caso del MSG o 187.5 µL de metanol absoluto para el MSM (13, 25).

***Actividad enzimática de alcohol oxidasa.*****Buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5 a 25°C**

Disolver 1.36 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 90 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 con KOH 1 M. Llevar a 100 mL con agua destilada.

**AOX 0.1 U/mL**

Mezclar 1 µL de AOX 1U/µL (Sigma) con 999 µL de buffer de fosfato de potasio 100 mM frío, tomar 10 µL de esta solución y llevar a 100 µL con el mismo buffer. Preparar antes de usar.

**ABTS 2 mM**

Disolver 10.96 mg de ABTS en 10 mL de buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5.  
Prepárese inmediatamente antes de usar.

Solución de peróxido de hidrógeno 0.003% (p/p).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3%. Mezclar 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% con 990 µL de agua destilada.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.003%. Mezclar 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3% con 990 µL de agua destilada.

Preparar estas soluciones inmediatamente antes de usar.

**Metanol 1.0%**

Mezclar 10 µL de metanol con 990 µL de agua destilada

Prepárese inmediatamente antes de usar.

**Peroxidasa 2 mg/mL**

Disolver 1 mg de peroxidasa en 500 µL de buffer de fosfato de potasio 100 mM frío.

Almacenar a -20°C protegida de la luz.

**Peroxidasa 250 U/mL (POD)**

Mezclar 62.5 µL de peroxidasa 2 mg/mL con 37.5 µL de buffer de fosfato de potasio 100 mM frío. Preparar antes de usar.

*Actividad enzimática de catalasa.***Buffer de fosfato de potasio 50 mM, PH=7.0**

Pesar 680.5 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y disolverlo en 75 mL de agua destilada, regular el pH con KOH 1M y aforar a 100 mL con agua destilada.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6% (p/v)**

Mezclar 90 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% con 410 µL con el buffer de fosfato.

*Actividad enzimática de β-galactosidasa.***Buffer Z, pH 7.0.**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mM, β-mercaptoetanol 50 mM.

Disolver 16.1 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5.5 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.75 g de KCl, 0.246 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.7 mL de β-mercaptoetanol en 950 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH o HCl y llevar hasta 1L con agua desionizada. No autoclavar. Almacenar a 4°C (13).

**ONPG. 4 mg/mL en buffer de fosfatos 100 mM, pH 7.0**

Disolver 1.61 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.55 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O en 90 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.0 con NaOH o HCl, agregar 400 mg de ONPG, agitar y disolver y llevar a 100 mL con agua destilada. Almacenar a 4 °C en la oscuridad (13).

**Carbonato de sodio 1M**

Disolver 12.4 de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 100 mL de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente (13).

***Lisis celular.*****Perlas de vidrio lavadas con ácido.**

Lavar las perlas con  $\text{HNO}_3$ , enjuagar con agua destilada hasta que el pH de los lavados sea ~5.3. Secar las perlas.

**DTE 100X (50 mM)**

Disolver 77.1 mg de DTE (PM = 154.2g) en 10 mL de agua milli-Q (13).

**PMSF 10X (10 mM)**

Disolver 43.5 mg de PMSF en 25 mL de isopropanol (13).

**Buffer de fosfato de potasio 11.2 mM, pH 7.4**

Disolver 382.28 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (PM = 136.09g) en 220 mL de agua destilada, ajustar el pH de esta solución con KOH, aforar a 250 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

**Buffer de lisis.** Buffer de fosfato de potasio 10 mM, pH 7.4 con DTE 0.5 mM y PMSF 1 mM (Preparar justo antes de usarse).

Mezclar 44.5 mL de buffer de fosfato de potasio 11.2 mM, 5 mL de PMSF 10X y 0.5 mL de DTE 100X

***Determinación de proteínas totales.*****Albumina sérica humana 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$** 

Pesar 1 mg de ASB y llevar a 1 mL en un matraz de aforación con agua destilada (ASB 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Tomar 500  $\mu\text{L}$  de esta solución y llevar a 10 mL en un matraz de aforación con agua destilada.

**Reactivo de Coomassie. (23)**

Disolver 100 mg del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95 %, agitar vigorosamente. Agregar 100 mL de ácido fosfórico al 85 %. Mezclar vigorosamente por 20-30 min. Llevar a 1 L con agua destilada, agitar por 20-30 min y filtrar con papel filtro Whatman no. 1 para eliminar el colorante no disuelto. Esta solución es estable por 1-2 semanas mantenida en frío.

*Proliferación peroxisomal.***KMnO<sub>4</sub> 1.5%****Disolver 1.5 g de KMnO<sub>4</sub> en 100 mL de agua milli-Q.****Acetato de uranilo 1%.****Disolver 1 g de acetato de uranilo en 100 mL de agua milli-Q.****Etanol 50%****Mezclar 50 mL de etanol absoluto con 50 mL de agua destilada****Etanol 70%****Mezclar 70 mL de etanol absoluto con 30 mL de agua destilada****Etanol 96%****Mezclar 96 mL de etanol absoluto con 4 mL de agua destilada****Epón:óxido de propileno 1:1****Mezclar 50 mL de epón con 50 mL de óxido de propileno.**





