

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



ANÁLISIS DE LA RESPUESTA METABÓLICA INVOLUCRADA EN
LA OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO PARA
INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS
HETERÓLOGAS EN LA LEVADURA
METILOTROFICA *Pichia pastoris*

Por

Q.B.P. Miguel Castillo Galván

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA

AGOSTO 2014

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA METABÓLICA INVOLUCRADA EN
LA OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO PARA
INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS
HETERÓLOGAS EN LA LEVADURA
METILOTRÓFICA *Pichia pastoris*.



Comité de tesis

Dra. Martha Guerrero Olazarán

Director de la tesis

Dr. José María Viader Salvadó

Secretario

Dr. Luis Jesús Galán Wong

Vocal

Dr. Benito Pereyra Alférez

Vocal

Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos

Vocal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



ANÁLISIS DE LA RESPUESTA METABÓLICA INVOLUCRADA EN
LA OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO PARA
INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS
HETERÓLOGAS EN LA LEVADURA
METILOTRÓFICA *Pichia pastoris*.

Presenta:

Q.B.P. MIGUEL CASTILLO GALVÁN

DR. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN

Director de Tesis

DRA. JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ

Co-Director de Tesis

A Mili y a Juan Miguel, el motor de mi vida.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo titulado “ANÁLISIS DE LA RESPUESTA METABÓLICA INVOLUCRADA EN LA OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN LA LEVADURA METILOTRÓFICA *Pichia pastoris*.” se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección del Dra. Martha Guerrero Olazarán y la Co-Dirección del Dr. José M Viader Salvadó.

Parte del presente trabajo ha sido presentado en lo siguientes congresos:

Castillo Galván M, Fuentes Garibay JA, Guerrero Olazarán M, Viader Salvadó JM. 2009. Producción en biorreactor de una fitasa bacteriana con cepas recombinantes de *Pichia pastoris* y su purificación del medio de cultivo. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras, Acapulco, Gro. Abstract. OV-03.

Castillo Galván M, Iracheta Cárdenas MM, Viader Salvadó JM, Guerrero Olazarán M. 2011. Optimización de la producción de una fitasa termoestable con una estructura de hélice en *Pichia pastoris* a nivel de biorreactor de 5 L. XIV Congreso nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Querétaro, Qro. Abstract CV-26.

Castillo Galván M, Viader-Salvado JM, Guerrero Olazarán M, Iracheta Cárdenas MM. 2011. Efecto de la temperatura en un bioproceso para la producción de una fitasa termoestable en *Pichia pastoris*. XIV Congreso nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Querétaro, Qro. Abstract OV-04.

Castillo-Galván M, Félix-Castro MB, Iracheta-Cárdenas MM, Viader- Salvadó JM, Guerrero-Olazarán M. 2013. Expression levels of genes involved in the production and secretion of a recombinant phytase in *Pichia pastoris* and correlation with the physiological activity of the host and the production level of the recombinant product. 2013. XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería and 12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganism, Cancun, Qro. Abstract VI-O01.

Además, ha sido publicado en:

Viader-Salvadó JM, Castillo-Galván M, Fuentes-Garibay JA, Iracheta-Cárdenas MM, Guerrero-Olazarán M. Optimization of five environmental factors to increase beta-propeller phytase production in *Pichia pastoris* and impact on the physiological response of the host. Biotechnol Prog. 29 (6):1377-85.

Derivada del presente trabajo fue publicada la tesis de licenciatura:

Análisis de la expresión de genes involucrados en los procesos de secreción, proteólisis y metabolismo del metanol de la cepa KM71FTEII de *Pichia pastoris* cultivada a dos condiciones de cultivo, presentada por Mónica B. Felix Castro y mediante la cual le fue concedido el grado de Licenciada en Biotecnología Genómica. Agosto 2013.

AGRADECIMIENTOS

En principio, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Martha Guerrero Olazarán y al Dr. José María Viader por sus consejos y guía así como por permitirme ser parte de su equipo de trabajo durante los últimos 11 años.

Gracias a mi esposa, la M.C. Citlali Chacón Cardosa, por su soporte para la conclusión de este trabajo, así mismo a mi Madre, la Sra. Mirna Irasema Galván Chapa. A mis suegros, Dra. Rebeca Cardosa y M.V.Z. Juan Chacón, por permitirme formar una vida junto a su hija y por su apoyo.

Agradecimiento a mis compañeros de largo tiempo en el laboratorio, especialmente a mi hermano, el Q.B.P. Mauricio Castillo Galván, al M.C. José Antonio Fuentes Garibay, al Biol. Jose Alberto Aguilar, a los L.B.G. Eduardo Almeyda y Mónica Felix Castro, y al Dr. Juan Gallegos, sin cuyos aportes al grupo de trabajo, esta tesis no existiría.

Durante 6 años de arduo trabajo, me es grato mencionar a los estudiantes que enriquecieron con sus aportes técnicos este trabajo, así mismo, espero con absoluta franqueza, que ellos se hayan enriquecido en la misma medida de manera académica. Esperando no omitir a ninguno y pidiendo una disculpa de antemano en caso que así sea, gracias a Francisco Balderas, Ana Herrera, Edgar Arroyo, Cindy Ramirez, Omayra Bolaños, Paulina Gamez, Carlos Carrillo, Carlos Espinoza, Enrique Zamacona, Carolina Becerril, Ariel Benavides, Diego Benitez, Aleyda Sierra y Melissa Leija.

Gracias a Miriam Gracia, Lourdes Gracia, Samantha Marcos y Marco de la Torre por darme la oportunidad de trabajar en su proyecto llamado RDLA y en el cual durante 2012 tuve la oportunidad de ingresar, espero contribuir para que siga rindiendo grandes frutos en el futuro.

Agradecimientos especiales al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de este trabajo, así mismo por los apoyos a los diferentes proyectos de nuestro grupo de trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABLAS.....	xxi
LISTA DE ECUACIONES.....	xxiv
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	xxv
RESUMEN.....	xxx
ABSTRACT.....	xxxii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>P. pastoris</i> como sistema de producción de proteínas heterólogas.....	1
1.2 Bioprocesos con <i>P. pastoris</i> y su optimización.....	2
1.3 Estudio de la expresión de genes en <i>P. pastoris</i> . ¿Qué avances ha producido?, ¿Qué perspectivas hacia el futuro?.....	2
1.4 Objetivo y resultados del presente trabajo.....	3
2 HIPÓTESIS.....	5
3 OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo general.....	5
3.2. Objetivos específicos.....	5
4 ANTECEDENTES.....	6
4.1 <i>P. pastoris</i> como hospedero para la producción de proteínas	

heterólogas.....	7
4.1.1 Características del sistema de expresión de <i>P. pastoris</i>	8
4.1.1.1. Vectores de expresión de <i>P. pastoris</i>	8
4.1.1.2 Vectores de expresión acoplados al promotor pAOX1.....	10
4.1.1.3 Metabolismo de metanol y promotores de las enzimas Alcohol oxidasa I y II (pAOX1 y pAOX2).....	10
4.1.1.4 Secreción de la proteína heteróloga.....	11
4.1.1.5 Cepas de <i>P. pastoris</i> para la expresión de proteínas heterólogas.....	12
4.1.2 Fenotipo de utilización de metanol (Mut).....	13
4.1.3 Bioprocesos con <i>P. pastoris</i>	13
4.2 Efecto y optimización de condiciones de cultivo para producción de proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i>	16
4.2.1 La temperatura en los cultivos de <i>P. pastoris</i>	17
4.2.2 Aeración y control del oxígeno disuelto.....	19
4.2.3 El pH en los cultivos de <i>P. pastoris</i>	19
4.2.4 Concentración de metanol en el medio de cultivo.....	20
4.2.5 Densidad celular al inicio de la inducción.....	21
4.2.6 Fuente de carbono adicional al metanol.....	22
4.2.7 Fuente de nitrógeno.....	23
4.2.8 Efecto multifactorial de las condiciones de cultivo.....	23
4.3 Diseños experimentales multifactoriales y producción de proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i>	25
4.4 Optimización de sistemas de producción por el Método Simplex.....	26

4.5 Efecto de la sobre-producción de proteínas sobre el metabolismo de <i>P. pastoris</i>	29
4.5.1 Secreción y plegamiento de la proteína heteróloga.....	29
4.5.2 Remoción del péptido señal para la secreción de la proteína heteróloga.....	32
4.5.3 Producción y secreción de proteasas al medio de cultivo.....	32
4.6 Secuenciación del genoma de <i>P. pastoris</i> e importancia en los estudios de expresión de genes en <i>P. pastoris</i>	33
4.7 Técnica de RT-qPCR como herramienta para el análisis de la expresión génica.....	34
4.7.1 Análisis de datos y diseño experimental de los ensayos de RT-qPCR.....	37
4.8 Estudio de la expresión de genes en rutas metabólicas de <i>P. pastoris</i>	40
4.8.1 Plegamiento y secreción de proteínas.....	40
4.8.2 Metabolismo de metanol.....	41
5 MÉTODOS.....	42
5.1 Material biológico y equipos.....	43
5.2 Estrategia general.....	45
5.3 Optimización de factores ambientales que definen las condiciones de cultivo para incrementar la producción una fitasa extracelular en <i>P. pastoris</i> . Etapa 1.....	48
5.3.1 Definición de la combinación de variables para las condiciones de cultivo.....	48
5.3.2 Diseño del proceso de optimización empleando el método multifactorial Simplex Secuencial.....	48
5.3.3 Proceso de optimización empleando el método multifactorial	52

Simplex Secuencial.....	
5.3.4 Estrategia de cultivos en biorreactor de 5 L.....	53
5.3.4.1 Preparación y conservación de inóculos para los cultivos en biorreactor.....	54
5.3.4.2 Cultivo de lote con glicerol.....	56
5.3.4.3 Cultivo de lote alimentado con glicerol.....	57
5.3.4.4 Cultivo de lote alimentado con metanol (inducción).....	57
5.3.4.5 Análisis y control <i>in situ</i> (in line).....	58
5.3.4.6 Toma de muestra para el análisis fisiológico en discontinuo (off-line).....	58
5.3.5 Determinación y cálculo de producción.....	59
5.3.5.1 Determinación de actividad de fitasa.....	59
5.3.6 Determinación de parámetros relacionados con la respuesta fisiológica del hospedero.....	63
5.3.6.1 Determinación de la demanda de metanol.....	63
5.3.6.2 Determinación de biomasa y densidad celular.....	63
5.3.6.3 Determinación de la velocidad específica de crecimiento.....	63
5.3.6.4 Rendimiento de la producción de fitasa extracelular por biomasa.....	65
5.3.6.5 Rendimiento celular debido al consumo de metanol....	65
5.3.6.6 Rendimiento de la producción de fitasa extracelular por consumo de metanol.....	66
5.3.6.7 Determinación de actividad de proteasas totales.....	66

5.3.6.8 Determinación de niveles de secreción de fitasa por ELISA.....	69
5.4 Etapa 2. Análisis de la expresión de genes involucrados en la producción y secreción de la fitasa recombinante y correlación con la respuesta fisiológica del hospedero y con la producción extracelular del producto recombinante.....	77
5.4.1 Diseño de experimentos.....	77
5.4.2 Selección de genes y diseño de oligonucleótidos específicos y sondas de hidrólisis.....	79
5.4.3 Método de cultivo y análisis de parámetros fisiológicos y producción de fitasa extracelular.....	81
5.4.4 Muestreo de cultivos y conservación de células para preparación de RNA total.....	82
5.4.5 Obtención de preparaciones de RNA total.....	83
5.4.6 Transcripción inversa.....	87
5.4.7 qPCR.....	90
5.4.8 Linealidad y eficiencia de la reacción de qPCR.....	97
5.4.9 Análisis de los niveles de expresión de los genes en estudio a dos condiciones de cultivo.....	98
5.4.9.1 Determinación de los genes normalizadores en el cálculo de la expresión relativa.....	100
5.4.9.2 Cálculo de los niveles de expresión relativa.....	101
5.4.9.3 Comparación de los niveles de expresión relativa de los genes en estudio.....	102
5.5 Correlación de la expresión de genes con la respuesta fisiológica	103

del hospedero.....	104
6 RESULTADOS.....	104
6.1 Optimización de factores ambientales que definen las condiciones de cultivo para incrementar la producción de una fitasa extracelular en <i>Pichia pastoris</i>	104
6.1.1 Definición de la combinación de variables para las condiciones de cultivo.....	104
6.1.2 Diseño y proceso de optimización empleando el método multifactorial Simplex Secuencial.....	105
6.1.3 Oxígeno disuelto y metanol en línea.....	109
6.1.4 Crecimiento celular.....	112
6.1.5 Consumo de metanol y velocidades de demanda de metanol.....	114
6.1.6 Producción de proteasas totales.....	115
6.1.7 Secreción de fitasa.....	116
6.2 Correlación de la respuesta fisiológica con el aumento de la producción extracelular de fitasa.....	117
6.2.1 Comportamiento de las condiciones de cultivo en la optimización de la producción de fitasa extracelular.....	117
6.2.2 Comportamiento del consumo de metanol, producción de proteasas, secreción de fitasa, crecimiento celular (μ) y rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$) durante la optimización de la producción de fitasa extracelular.....	118
6.3 Análisis de la expresión de genes involucrados en la producción y secreción de la fitasa recombinante y correlación con la respuesta fisiológica del hospedero y la producción de fitasa extracelular.....	121

6.3.1 Resumen del análisis de parámetros fisiológicos y producción de fitasa extracelular.....	121
6.3.2 Selección de genes y diseño de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis específicos para los genes a analizar.....	123
6.3.3 Calidad del RNA total extraído.....	127
6.3.4 Especificidad de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis.....	130
6.3.5 Determinación de la eficiencia, linealidad e intervalos lineales para los genes en estudio en los ensayos de qPCR.....	131
6.3.6 Testigos negativos de la RT-qPCR y análisis de genes normalizadores.....	133
6.3.7 Comparación de los niveles de expresión relativa de los genes en estudio.....	134
6.3.8 Comparación de los niveles de expresión relativa a lo largo del cultivo con los niveles de expresión del tiempo 0 h de inducción con metanol.....	140
6.3.9 Comparación de los niveles de expresión relativa en las dos condiciones de cultivo.....	142
6.4 Correlación de la expresión de genes con la respuesta fisiológica del hospedero.....	148
6.4.1 Correlación de la expresión del gen <i>FTEII</i> con la producción de fitasa extracelular, porcentaje de secreción de fitasa y producción total de fitasa.....	148
6.4.2 Correlación de la expresión del gen <i>AOX2</i> con el crecimiento celular, consumo de metanol y producción de fitasa extracelular.....	151
6.4.3 Correlación de la expresión de los genes <i>PEP4</i> , <i>PRC1</i> y <i>PRB1</i> con la actividad de proteasas extracelulares y producción de fitasa.....	152

extracelular.....	
6.4.4 Correlación de la expresión de los genes <i>KEX2</i> y <i>KAR2</i> con la producción de fitasa extracelular.....	152
7 DISCUSIÓN.....	155
8 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	166
ANEXOS.....	168
LITERATURA CITADA.....	179
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	193

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Papel de la enzima <i>KEX2</i> en el corte del péptido señal del factor alfa de <i>S. cerevisiae</i> en <i>P. pastoris</i>	11
2	Etapas de un biproceso de producción de proteínas heterólogas con la levadura <i>P. pastoris</i>	14
3	Control del bioproceso con <i>P. pastoris</i>	16
4	Representación geométrica de un diseño de optimización Simplex con dos factores.....	28
5	Representación del papel de la chaperona BiP y su relación con el gen Ire1 y Hac1 de la respuesta UPR y con la ERAD.....	31
6	Modelo esquemático que ilustra la acción coordinada de UPR y ERAD.....	31
7	Esquemas resumidos de la ruta de metabolismo de metanol y la ruta de secreción de proteínas en <i>P. pastoris</i>	42
8	Estrategia general de la metodología empleada.....	47
9	Metodología empleada para la optimización por Simplex secuencial...	50
10	Metodología general de cultivo en biorreactor de 5 L.....	54
11	Metodología para la obtención de inóculos.....	55
12	Toma de muestra para análisis en discontinuo.....	59

13	Cromatografía de exclusión molecular para desalar las muestras.....	60
14	Determinación de actividad de fitasa.....	61
15	Determinación analítica de biomasa en peso húmedo.....	64
16	Determinación de proteasas totales en el medio de cultivo.....	68
17	Fundamento del ELISA directo usado para la determinación.....	70
18	Preparación de proteínas solubles intracelulares.....	74
19	Aplicación de las muestras en los ensayos de ELISA directo.....	74
20	Protocolo del ELISA directo.....	75
21	Estrategia general para medir la expresión relativa de genes.....	78
22	Diagrama de flujo con la estrategia para en análisis de los niveles de expresión relativa de los genes en estudio bajo dos condiciones de cultivo (CM y CP).....	82
23	Toma y conservación de muestra para extracción de RNA total.....	83
24	Metodología de la extracción de RNA.....	84
25	Diagrama de flujo con la estrategia para el análisis de los niveles de expresión relativa ejemplificando la muestra CM1-M0. Todas las muestras se analizaron empleando la misma estrategia.....	99
26	Agrupamiento de pares sin ponderación y con medias aritméticas de los experimentos revisados en la literatura.....	105
27	Actividad de fitasa extracelular a lo largo del tiempo de inducción del gen heterólogo para los diez cultivos realizados con la cepa KM71FTEII	

	a diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción.....	108
28	Actividad de fitasa extracelular a las 68 h de inducción en los diez cultivos con la cepa KM71FTEII. Los cultivos están ordenados de menor a mayor producción de fitasa extracelular. Las líneas punteadas encierran el bloque inicial de optimización. Los cultivos A, I y J representan al segundo, tercer y cuarto bloque.....	108
29	Oxígeno disuelto y concentración del metanol en línea de los diez cultivos del método simplex.....	111
30	Biomasa total en gramos totales de peso seco a lo largo del tiempo de inducción del gen heterólogo para los diez cultivos realizados con la cepa KM71FTEII a diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción.....	112
31	Consumo de metanol a lo largo del tiempo de inducción del gen heterólogo para los diez cultivos realizados con la cepa KM71FTEII a diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción.....	114
32	Actividad de proteasas a lo largo del tiempo de inducción del gen heterólogo para los diez cultivos realizados con la cepa KM71FTEII a diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción.....	115
33	Comportamiento de las condiciones de cultivo en la producción de fitasa extracelular.....	117
34	Consumo de metanol, velocidad específica de crecimiento, μ , actividad extracelular de proteasas, porcentaje de secreción de fitasa, y rendimiento producto-biomasa a las 68 h de inducción de los cultivos con la cepa KM71FTEII bajo diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción.....	120

35	Alineamientos en blast-n de los oligonucleótidos diseñados con su secuencia blanco correspondiente en el genoma de <i>P. pastoris</i>	126
36	Electroferograma del RNA total de la muestra de 22 h de inducción del primer cultivo en condiciones de alta producción de fitasa extracelular. Los dos picos altos corresponden a los RNA ribosomales 18S y 26S, respectivamente.....	128
37	Geles de electroforesis digital obtenidos mediante análisis de microfluidos de las preparaciones de RNA obtenidas de los cultivos 68 h de inducción.....	128
38	Geles de electroforesis digital obtenidos mediante análisis de microfluidos de las preparaciones de RNA obtenidas de los cultivos. 68 h de inducción.....	129
39	Curva de disociación del producto formado en la amplificación del transcrito de los genes de estudio empleando SYBR green para su detección.....	131
40	Correlación de los valores del ciclo umbral (C_T) respecto al logaritmo de la cantidad equivalente de RNA, obtenida a partir de las curvas de amplificación del transcrito correspondiente al gen <i>kex2</i> de diluciones seriadas del DNAC de 68 h de inducción correspondiente al cultivo CM1 de fitasa.....	132
41	Comparación de los niveles de expresión relativa del gen <i>KEX2</i> en las dos condiciones de cultivo evaluadas.....	143
42	Comparación de los niveles de expresión relativa del gen <i>AOX2</i> en las dos condiciones de cultivo evaluadas.....	144
43	Comparación de los niveles de expresión relativa del gen <i>PEP4</i> en las	

	dos condiciones de cultivo evaluadas.....	144
44	Comparación de los niveles de expresión relativa del gen <i>PRC1</i> en las dos condiciones de cultivo evaluadas.....	145
45	Comparación de los niveles de expresión relativa del gen <i>PRB1</i> en las dos condiciones de cultivo evaluadas.....	146
46	Comparación de los niveles de expresión relativa del gen <i>KAR2</i> en las dos condiciones de cultivo evaluadas.....	146
47	Comparación de los niveles de expresión relativa del gen <i>FTEII</i> en las dos condiciones de cultivo evaluadas.....	149
48	Niveles de expresión del gen <i>fteII</i> , producción de fitasa extracelular, porcentaje de secreción de fitasa y producción total de fitasa durante la etapa de inducción de los cultivos a condiciones de alta producción y baja producción de fitasa extracelular.....	151
49	Niveles de expresión de los genes <i>aox2</i> , crecimiento celular en peso seco y consumo de metanol durante la etapa de inducción de los cultivos a condiciones de alta y baja producción de fitasa extracelular	153
50	Niveles de expresión de los genes <i>pep4</i> , <i>prc1</i> , y <i>prb1</i> , y actividad de proteasas extracelulares durante la etapa de inducción de los cultivos a condiciones de alta y baja producción de fitasa extracelular.....	153
51	Niveles de expresión de los genes <i>kex2</i> y <i>kar2</i> durante la etapa de inducción de los cultivos a condiciones de alta y baja producción de fitasa extracelular.....	154

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I Vectores de expresión comunes para <i>P. pastoris</i>	9
II Cepas de <i>P. pastoris</i> utilizadas para expresión de proteínas heterólogas.....	12
III Tecnologías de detección, disponibles para RT-qPCR.....	38
IV Condiciones iniciales de los siete cultivos iniciales del diseño Simplex.....	50
V Tres cultivos finales del simplex con condiciones de cultivo optimizadas.....	51
VI Gradiente de intercambio aniónico.....	71
VII Curva de calibración para la determinación por ELISA.....	71
VIII Genes seleccionados para el análisis de expresión por qPCR.....	81
IX Mezcla de reacción para el tratamiento del RNA total con la DNAsa RQ1.....	88
X Mezcla de reacción para transcripción inversa.....	89
XI Condiciones del ensayo de síntesis de DNAc.....	89
XII Secuencias de oligonucleótidos y sondas utilizados en las qPCRs...	91
XIII Mezcla de reacción de la qPCR con SYBR Green.....	92
XIV Mezcla de trabajo para 20 ensayo de qPCR con SYBR Green.....	92
XV Condiciones del ensayo de qPCR empleando SYBR Green.....	94
XVI Ensayo de PCR para la optimización de oligonucleótidos.....	95
XVII Mezcla de reacción para el ensayo de qPCR empleando sondas de hidrólisis.....	96
XVIII Mezcla de trabajo para analizar las muestras de DNAc en los ensayos de qPCR empleando sondas de hidrólisis.....	96

XIX	Condiciones del ensayo de qPCR empleando sondas de hidrólisis...	97
XX	Diferentes combinaciones de genes normalizadores para su evaluación en el cálculo de la expresión relativa.....	101
XXI	Condiciones de cultivo calculadas para los cultivos de los bloques de optimización y producción total de fitasa a las 68 h de inducción	107
XXII	Parametros de crecimiento, rendimiento celular y consumo de metanol a las 68 h de inducción.....	113
XXIII	Producción total de fitasa, consumo de metanol, velocidad específica de crecimiento, actividad extracelularde proteasas, porcentaje de secreción de fitasa, y rendimiento producto-biomasa a las 68 h de inducciónde los cultivos con la cepa KM71FTEII bajo diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción.....	119
XXIV	Determinación de parámetros fisiológicos seleccionados para el análisis y comparación con su cultivo correspondiente al simplex...	122
XXV	Formación de estructuras secundarias de tipo horquilla, homodímero y heterodímero de las secuencias de lo oligonucleótidos diseñados.....	124
XXVI	Genes seleccionados en el estudio y secuencia de oligonucleótidos específicos.....	125
XXVII	Cantidad y calidad del RNA total extraído para las muestras de alta y baja producción de fitasa extracelular a diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción.....	127
XXVIII	Índice de integridad de RNA total extraído para las muestras de alta y baja producción de fitasa extracelular.....	130
XXIX	Valores de Eficiencia (E), linealidad (r^2) y el intervalo de linealidad (C_T) para cada uno de los genes en estudio en los ensayos de qPCR	132
XXX	Media del coeficiente de variación (%) de los niveles de expresión relativa de los genes en estudio empleando diferentes combinaciones de normalizadores a lo largo del primer cultivo	

	independiente de alta producción de fitasa extracelular.....	133
XXXI	Niveles de expresión relativa del gen <i>KEX2</i> a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.....	134
XXXII	Niveles de expresión relativa del gen <i>AOX2</i> a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.....	135
XXXIII	Niveles de expresión relativa del gen <i>PEP4</i> a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.....	135
XXXIV	Niveles de expresión relativa del gen <i>PRC1</i> a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.....	136
XXXV	Niveles de expresión relativa del gen <i>PRB1</i> a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.....	137
XXXVI	Niveles de expresión relativa del gen <i>KAR2</i> a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.....	138
XXXVII	Niveles de expresión relativa del gen <i>FTEH</i> a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.....	139
XXXVIII	Diferencias significativas obtenidas de la comparación de la expresión relativa de muestras obtenidas a tiempos de inducción contiguos a lo largo del cultivo CM.....	139
XXXIX	Diferencias significativas obtenidas de la comparación de la expresión relativa de muestras obtenidas a tiempos de inducción contiguos a lo largo del cultivo CP.....	140
XL	Diferencias significativas obtenidas de la comparación de la expresión relativa de muestras obtenidas a diferentes tiempos de inducción respecto al inicio de la inducción del cultivo CM.....	142
XLI	Diferencias significativas obtenidas de la comparación de la expresión relativa de muestras obtenidas a diferentes tiempos de inducción respecto al inicio de la inducción del cultivo CP.....	142

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación	Página
1 a: ecuación de reflexión, b: ecuación de contracción r, c: ecuación de contracción p, d: ecuación de expansión.....	28
2 Ecuación Simplex secuencial usada para obtener nuevos valores de cada factor para las nuevas condiciones de cultivo.....	51
3 Ecuación de contracción P usada para obtener nuevos valores de cada factor para las nuevas condiciones de cultivo.....	51
4 Cálculo del volumen de inóculo inicial.....	55
5 Cálculo de actividad de fitasa.....	62
6 Cálculo de actividad extracelular total de fitasa.....	62
7 Cálculo de la velocidad de adición o demanda de metanol.....	63
8 Cálculo de la densidad celular.....	64
9 Calculo de rendimiento producto por unidad de biomasa.....	65
10 Rendimiento celular sobre consumo de metanol.....	65
11 Rendimiento de producción de fitasa extracelular por consumo de metanol.....	66
12 Cálculo de TNBSA-amina formado.....	67
13 Cálculo de actividad de proteasa extracelular.....	68
14 Volumen de medio de cultivo equivalente a 40 mg de peso húmedo.	72
15 Cálculo de la concentración de FTEII en la muestra.....	75
16 Cálculo de la concentración de FTEII intracelular.....	76
17 Porcentaje de secreción de FTEII.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS Y UNIDADES

Según sea el caso puede corresponder a:

%	Porcentaje de concentración masa sobre volumen, unidad de concentración. Porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Porcentaje de secreción de FTEII.
[FTEII] _i	Concentración de FTEII intracelular por volumen de cultivo en mU/mL.
°C	Grados centígrados, unidad de temperatura
$2\Delta\Delta C_t$	Gen de la enzima
$2^{-\Delta\Delta CT}$	Método para determinar expresión por qPCR
A_{etf}	Actividad extracelular total de fitasa resultante
<i>AOX1</i>	Gen de la enzima Alcohol Oxidasa 1
AOX1	Enzima Alcohol Oxidasa 1
<i>AOX2</i>	Gen de la enzima Alcohol Oxidasa 2
AOX2	Enzima Alcohol Oxidasa 2
A_{vf}	Actividad volumétrica de fitasa en U/L
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
CaSO ₄	Sulfato de Calcio
CoCl ₂	Cloruro de Cobalto
C_T	Ciclo de cruce del umbral, línea de intersección entre la línea de amplificación y la línea del umbral durante una qPCR
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
D_M	Demanda de metanol
DNA	Ácido desoxiribonucleíco
DNAc	Cadena complementaria de DNA
dNTPs	Desoxinucleotidos
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm, unidad de turbidez
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

FeSO ₄	Sulfato de Hierro (III)
FTEII	Fitasa con estructura de hélice denominada FTEII
g	Gramos, unidad de masa
g	Fuerza “g”, unidad de aceleración
g/h	Velocidad de adición
	Según sea el caso puede corresponder a:
	Gramos de producto por litro de medio de cultivo, unidad de producción. Gramos de biomasa por litro de medio de cultivo, unidad de crecimiento celular.
g/L	Gramos de metanol por litro de medio de cultivo, unidad de concentración.
	Gramos de producto generado por hora, por cada litro de medio de cultivo, unidad de productividad
g/L*h	
<i>G6PD</i>	Gen de la enzima Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa
<i>GAP</i>	Gen de la enzima Gliceraldehido 3 Fosfato Deshidrogenasa
h	Horas, unidad de tiempo
H ₂ O	Agua
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HCl	Ácido Clorhídrico
IgG	Inmunoglobulina G
K ₂ SO ₄	Sulfato de Potasio
<i>KAR2</i>	Gen de la proteína chaperona BiP
kcal	Kilocaloría, unidad de energía
KCl	Cloruro de Potasio
<i>KEX2</i>	Gen de la enzima proteasa Kex2
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de Potasio
KM71	Cepa de <i>P. pastoris</i> con fenotipo mut ^s
KM71FTEII	Cepa KM71 de <i>P. pastoris</i> que contiene la secuencia nucleotídica que codifica para la fitasa con estructura de hélice denominada FTEII
KOH	Hidróxido de Potasio

L	Litro, unidad de volúmen
L/min	Flujo de aire por minuto
M	Molar, unidad de concentración
mg	Miligramos, unidad de masa
Mg ⁺	Cationes de Magnesio
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
min	Minutos, unidad de tiempo
mL	Mililitros, unidad de volúmen
mm	Milímetros, unidad de longitud
MnCl ₂	Cloruro de Magnesio
MnSO ₄	Sulfato de Manganeso
mol	Moles, unidad de masa
mU	Miliunidades, unidad de actividad de fitasa
mut ^s	Fenotipo de utilización de metanol “slow”
Na ⁺	Cationes de Sodio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de Sodio
Na ₂ MoO ₄	Molibdato de Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
NaI	Ioduro de Sodio
ng	Nanogramos, unidad de masa
NH ₄ OH	Hidróxido de Amonio
nM	Nanomolar, unidad de concentración
nm	Nanómetros, unidad de longitud
O ₂	Oxígeno
oligo(dT)	Oligonucleótido de Desoxitimas
P	Fósforo
pb	Pares de base en la cadena de DNA, unidad de longitud molecular
PBS	Buffer de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la DNA-polimerasa

<i>PEP4</i>	Gen de la enzima Proteinasa A
pH	Potencial de hidrógeno, unidad de acidez o basicidad
PH	Pesó húmedo de células, unidad de crecimiento celular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNPP	p-Nitrofenilfosfato
<i>PRB1</i>	Gen de la enzima Proteinasa B
<i>PRC1</i>	Gen de la enzima Carboxipeptidasa Y
PS	Peso seco de células, unidad de crecimiento celular
qPCR	Reacción en cadena de la DNA-polimerasa detectada en tiempo real
q _s	Velocidad específica de consumo del sustrato metanol
r ²	Coefficiente de determinación
RIN	Numero de integridad del RNA
RNA	Ácido oxiribonucleíco
rpm	Revoluciones por minuto, unidad de velocidad angular
RT	Reacción de la enzima RNA Transcriptasa Inversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa acoplada a la reacción de la RNA Transcriptasa Inversa
RTqPCR	Reacción en cadena de la DNA-polimerasa detectada en tiempo real acoplada a la reacción de la RNA Transcriptasa Inversa
s	Segundos, unidad de tiempo
TBE	Buffer Tris-EDTA
TBS	Buffer TRIS salino
TCG	Tiocianato de Guanidina
TNBSA	Ácido Tri-nitrobencensulfonico
Tris	Tris(Hidroximetil-aminometano)
U	Unidades de actividad enzimática
U/L	Actividad enzimática por litro de volúmen
UFC	Unidades formadoras de colonia, unidad de crecimiento celular
UV	Luz ultravioleta
V	Volúmen
V	Voltios, unidad de voltaje

V_{DM}	Velocidad de adición de metanol en mL/min
VIS	Luz visible
x	Variable independiente, valor corresponde a diferentes unidades según sea el caso en el contenido de esta tesis
X	Promedio, valor corresponde a diferentes unidades según sea el caso en el contenido de esta tesis
$Y_{p/s}$	Rendimiento de la producción extracelular de fitasa proveniente de metanol
$Y_{p/x}$	Rendimiento de la producción extracelular de fitasa sobre biomasa total
<i>YPT1</i>	Gen de la enzima
$Y_{x/s}$	Rendimiento celular proveniente del sustrato metanol
$ZnCl_2$	Cloruro de Zinc
ΔG	Energía libre
μ	Velocidad específica de crecimiento
μL	Microlitros, unidad de volumen
μm	Micrómetro, unidad de longitud
μM	Micromolar, unidad de concentración

RESUMEN

P. pastoris es una levadura metilotrófica capaz de utilizar metanol como una sola fuente de carbono y energía y es ampliamente usada para la expresión de genes y producción de proteínas recombinantes con fines de investigación o industriales.

En el presente trabajo, se utilizó una estrategia de diseño de experimentos (método de optimización Simplex) para optimizar cinco factores ambientales (temperatura, pH, concentración de metanol, densidad celular inicial y presencia de sorbitol) que definen las condiciones de cultivo en la etapa de inducción para aumentar la producción de la fitasa “beta-propeller” FTEII en cultivos de *P. pastoris* en biorreactor. Además, se determinó la correlación de este proceso de optimización con la actividad fisiológica y la expresión de genes del organismo huésped.

Con el proceso de optimización, se alcanzaron hasta 347.682 U (82.814 U/L o 6,4 g/L del medio de cultivo) de fitasa a 68 h de la inducción.. Los resultados indican que el aumento en la producción de fitasa extracelular a través del proceso de optimización se correlaciona con un aumento en la actividad metabólica de *P. pastoris*, con una disminución de la actividad proteasas extracelulares, un aumento de secreción de la proteína recombinante alcanzando niveles de hasta en un 88%, y además un aumento de la eficiencia de la producción de fitasa extracelular por célula. El aumento de la producción de FTEII no se relacionó con la expresión del gen *FTEII* y el gen *AOX2*, sin embargo, este aumento podría estar relacionado con un aumento de la eficiencia del proceso de traducción, postraducción o secreción de FTEII, argumentos apoyados por la expresión diferencial (niveles más altos) de los genes *KAR2* y *KEX2* y los genes de proteasas vacuolares (*PEP4*, *PRB1*, y *PRCI*) los cuales juegan un papel clave en la vía de secreción y procesos postraduccionales de proteínas de *P. pastoris*, además del aumento de una actividad metabólica para la generación de energía requerida en estos procesos.

La información obtenida en el presente trabajo impacta directamente en el diseño de procesos más eficientes para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* aunado a la comprensión de la fisiología del hospedero bajo las condiciones del proceso.

ABSTRACT

P. pastoris is methylotrophic yeast capable of using methanol as a single source of energy and carbon and it has been broadly used to gene expression and production of recombinant proteins for industrial or research purposes.

During the present work, we used a design of experiments strategy (Simplex optimization method) to optimize five environmental factors (Temperature, pH, methanol, initial induction cell density and the presence of sorbitol) that define the culture conditions in the induction step to increase beta-propeller phytase production in *P. pastoris* bioreactor cultures. Furthermore, we have determined the correlation of this optimization process with the physiological activity and gene expression of the host organism.

Along the optimization process, up to 347,682 U (82,814 U/L or 6.4 g/L culture medium) of phytase at 68 h of induction was achieved. In addition, the impact of the optimization process on the physiological response of the host was evaluated. The results indicate that the increase in extracellular phytase production through the optimization process was correlated with an increase in metabolic activity of *P. pastoris*, shown by an increase in oxygen demand and methanol consumption that increase the specific growth rate. The increase in extracellular phytase production also occurred with a decrease in extracellular protease activity. Moreover, the optimized culture conditions increased the recombinant protein secretion by up to 88%, along with the extracellular phytase production efficiency per cell. The increased production of FTEII was not related to the expression of the *fteII* gene, as determined by qPCR the transcript levels were the same for both conditions (high and low FTE production). This increase is more like to be related with the *P. pastoris* protein secretion pathway, measured by an increase of protein secretion percentage (up to 88%) and also with the overexpression of the *Kar2* and *kex2* genes, which products, the BiP and KEX2 protein, play a key role into the secretion pathway.

The data obtained in this work, impact directly in designing more efficient *P. pastoris* production processes in the near future, as well as in the understanding regarding the physiology of the host organism during the process

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Pichia pastoris* como sistema de producción de proteínas heterólogas

Una amplia variedad de hospederos empleados para la expresión y producción de proteínas heterólogas de interés se ha hecho disponible desde el advenimiento de las tecnologías del ADN recombinante a principios de los años setentas.

P. pastoris es una levadura metilotrófica capaz de utilizar metanol como una sola fuente de carbono y energía. Originalmente fue desarrollada por la compañía de petróleo Phillips (Bartlesville, Oklahoma) (Sreekrishna, 2010) como un organismo útil para la bio-conversión del metanol en proteína unicelular, gracias a esto, en esta compañía durante los años setenta se desarrollaron procesos eficientes para la producción de biomasa (130 g L^{-1} en peso seco) que siendo impresionante, no logró competir económicamente con otra fuente de proteína del mercado: la soya. Después de esto, la compañía dirigió el futuro del producto hacia dos áreas: aplicación en alimentos y desarrollo de sistemas de expresión para proteínas heterólogas, la cual es de interés para el presente trabajo (Sreekrishna, 2010).

P. pastoris posee una vía metabólica altamente regulada para la utilización de metanol. Sintetiza enzimas que en presencia de otras fuentes de carbono son indetectables, pero que en presencia de metanol incrementan rápidamente su concentración en la célula. Este efecto se vislumbra dramáticamente para la enzima alcohol oxidasa (AOX1), la cual, supera el 30% de las proteínas totales en presencia de metanol. En base al promotor del gen que codifica para esta enzima, se logró tiempo después, desarrollar un sistema de expresión de proteínas heterólogas que funciona en presencia de metanol como fuente de carbono, sistema que hasta el día de hoy ha demostrado éxito en la producción de alrededor de 500 diferentes proteínas heterólogas y más de 3000 publicaciones científicas (Sreekrishna, 2010).

1.2 Bioprocesos con *P. pastoris* y su optimización

El sistema de expresión de *P. pastoris* no sería tan eficiente al día de hoy si no fuera por el desarrollo de bioprocesos controlados en biorreactor a gran escala que permiten altas producciones de biomasa ya que permite el control de diversas condiciones de cultivo tales como: temperatura, pH, adición de fuente de carbono y nitrógeno, control de oxígeno disuelto y agitación. Típicamente, este proceso se lleva a cabo en dos etapas: la primera, una etapa de crecimiento en una fuente de carbono tal como glicerol o glucosa que permite altas velocidades de crecimiento, la segunda, una etapa en presencia de metanol como fuente de carbono que permite a esta “maquinaria multiplicada” durante la etapa previa, producir altas cantidades de la proteína heteróloga. La optimización de condiciones de cultivo tales como las descritas anteriormente, ha demostrado también su influencia en la producción de la proteína heteróloga.

1.3 Estudio de la expresión de genes en *P. pastoris*. ¿Qué avances ha producido?, ¿Qué perspectivas hacia el futuro?

Desde mitad de la década pasada, con el desarrollo de las nuevas tecnologías para determinar la expresión de genes (qPCR, microarreglos, secuenciación de transcritos) se han desarrollado estudios que involucran la influencia de la expresión de ciertos genes en la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. Los primeros estudios de esta influencia se llevaron a cabo por microarreglos en el año 2008, durante los cuales se estudió enfáticamente el efecto de un fenómeno metabólico relacionado al plegamiento erróneo de proteínas en el retículo endoplásmico encontrando una ruta metabólica dentro de este organelo que era capaz de disminuir dramáticamente la producción de proteínas en la levadura (Gasser *et al.*, 2008). Posteriormente en el año 2009 (De Schutter *et al.*, 2009) se publicó el primer genoma completo de una cepa de *P. pastoris* (sección 4.6) lo cual abrió un umbral mucho más amplio para el estudio de expresión de genes y el efecto de estos en la producción de proteínas, así también ha abierto la perspectiva para hacer ingeniería metabólica en este organismo. Aunado a esto, el desarrollo de la PCR cuantitativa (qPCR) como herramienta de validación para

la expresión de genes ha permitido la publicación de diversos trabajos, que ya no solo quedan en el estudio fisiológico de *P. pastoris* sino también en su comportamiento genético.

Por lo tanto, las perspectivas a futuro son amplias, el estudio detallado de la expresión de genes en *P. pastoris*, y su influencia en la producción de proteínas permitirá el desarrollo de organismos mejorados en ciertas rutas metabólicas que ayuden a mejorar el proceso de producción así como la respuesta de la levadura a la producción de las proteínas heterólogas.

1.4 Objetivo y resultados del presente trabajo

En el presente trabajo se buscó optimizar la producción de la fitasa FTEII en cultivos en biorreactor de 5L, utilizando una estrategia de diseño de experimentos (método de optimización Simplex) para optimizar cinco factores ambientales (temperatura, pH, concentración de metanol, densidad celular inicial y presencia de sorbitol) que definen las condiciones de cultivo en la etapa de inducción. Además se evaluó la respuesta fisiológica del hospedero incluyendo la evaluación de la expresión de genes involucrados en la secreción de proteínas y metabolismo de metanol.

El presente trabajo, no solo trata con el proceso de optimización para incrementar la producción de una proteína heteróloga en *P. pastoris*, sino también contribuye a la comprensión del impacto que tienen las condiciones de cultivo sobre la respuesta fisiológica del hospedero, medida por el consumo de metanol, la velocidad específica de crecimiento, la actividad de proteasas en el medio de cultivo, el porcentaje de secreción de la fitasa FTEII, y el rendimiento producto respecto a la biomasa.

A pesar de que *P. pastoris* es uno de los organismos que más frecuentemente se usan para la producción de proteínas heterólogas (Sreekrishna, 2010), estudios sobre el comportamiento fisiológico y su relación con la producción de proteínas tiene aún que ser evaluada. Por esto, adicionalmente se incluyó el estudio de la expresión diferencial de siete genes involucrados en estos procesos fisiológicos en las condiciones de cultivo de mayor y menor producción de fitasa extracelular.

El método Simplex Secuencial Básico condujo a condiciones de cultivo con los cinco parámetros optimizados que permitieron a altos niveles de producción extracelular de FTEII. Esto mostró claramente la importancia de llevar a cabo un método de optimización simultánea multivariada del proceso, en vez de usar métodos de optimización tradicionales.

Estos resultados y su relación con la fisiología de *P. pastoris*, así como con la producción de fitasa extracelular se discuten a continuación.

La información obtenida en el presente trabajo impacta directamente en el diseño de procesos más eficientes para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*.

2 HIPÓTESIS

Factores ambientales que definen las condiciones de cultivo en la etapa de inducción de cultivos de *P. pastoris* afectan a la producción extracelular de una proteína recombinante y simultáneamente se altera la fisiología del hospedero y la expresión de genes involucrados en la producción y secreción de la proteína recombinante.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Evaluar el impacto del proceso de optimación de cinco factores ambientales para incrementar la producción de una proteína recombinante en *Pichia pastoris* sobre la respuesta fisiológica del hospedero y correlacionar la respuesta fisiológica con la expresión de genes involucrados en la producción y secreción de la proteína recombinante.

3.2 Objetivos específicos

1. Optimizar cinco factores ambientales que definen las condiciones de cultivo en la etapa de inducción para incrementar la producción extracelular en *P. pastoris* de una fitasa en cultivos en biorreactor.
 - 1.1. Plantear un diseño simplex secuencial para la optimización de las condiciones de cultivo.
 - 1.2. Desarrollar el proceso de optimización usando la producción de fitasa extracelular como factor de respuesta.
2. Evaluar el impacto del proceso de optimación sobre la respuesta fisiológica el hospedero.
3. Correlacionar la actividad fisiológica del hospedero con la expresión de genes involucrados en la producción y secreción de la fitasa recombinante, y con la producción del producto recombinante.
 - 3.1. Realizar cultivos que generan alta y baja producción de fitasa extracelular.
 - 3.2. Analizar la expresión de siete genes involucrados en la producción y secreción de fitasa.
 - 3.3. Correlacionar la respuesta fisiológica del hospedero con la expresión de genes involucrados en la producción y secreción del producto recombinante.

4.- ANTECEDENTES

4.1 *Pichia pastoris* como hospedero para la producción de proteínas heterólogas

P. pastoris es una levadura metilotrófica que puede ser modificada genéticamente para la producción de proteínas heterólogas, gracias a una serie de características favorables que posee dicha levadura (Cregg *et al.*, 2000, Macauley *et al.*, 2005, De Schutter *et al.*, 2009). *P. pastoris* es una levadura de la familia Saccharomycetaceae estrechamente relacionada con la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura presenta varias ventajas para la producción de proteínas recombinantes, siendo, las más importantes: el uso de un promotor fuerte y regulable para la inducción del gen heterólogo, fácil manipulación genética, capacidad de crecer a altas densidades celulares (hasta 500 g/L de peso húmedo) , altos niveles de secreción de la proteína heteróloga casi libre de la presencia de otras proteínas, ausencia de patogenicidad humana, plegamiento correcto de proteínas, modificaciones postraduccionales similares a las de los organismos eucariontes tales como glicosilación, metilación, cortes proteolíticos y marcaje para su transporte a través de los sistemas celulares (Cereghino y Cregg, 2000, Li *et al.*, 2007). Además, su manipulación con fines biotecnológicos es más sencilla y menos costosa que otros sistemas de expresión de eucariotes superiores y generalmente se obtienen niveles de expresión más altos que en éstos últimos (Romanos, 1995, Li *et al.*, 2007) también, comparado con cultivos celulares eucariontes, el sistema de *P. pastoris* no requiere medios de cultivo complejos ú otros controles de las condiciones de cultivo fuera de oxígeno disuelto, temperatura, pH y fuente de carbono (Macauley *et al.*, 2005). Por lo mencionado anteriormente, el sistema de expresión de *P. pastoris* ofrece diversas ventajas que han permitido (Cereghino *et al.* 2002) hasta la fecha, la producción de más de 500 proteínas heterólogas en *P. pastoris* y la publicación de más de 3,000 artículos científicos utilizando a este organismo (Sreekrishna 2010).

4.1.1 Características del sistema de expresión de *P. pastoris*

El sistema de expresión de *P. pastoris* se compone de dos partes. Vectores de expresión y cepas con la capacidad de acarrear estos vectores. A continuación se describen brevemente estos dos componentes, así como otras características de estos. El sistema de expresión utilizando vectores con el promotor de la enzima Alcohol Oxidasa 1 (pAOX1) es de particular importancia en el presente trabajo, por lo que se describirá con más detalle.

4.1.1.1 Vectores de expresión de *P. pastoris*

Los vectores de expresión diseñados para la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* comparten muchas características en común (tabla I) destacando, una secuencia promotora seguido de uno o más sitios de restricción para la inserción de genes heterólogos, sitios específicos de terminación de la transcripción. Además, la gran mayoría de estos vectores incluyen el gen HIS4 de *P. pastoris* como marcador de selección por auxotrofia a histidina. Así mismo, estos vectores incluyen secuencias para la replicación y amplificación en bacterias. (Higgins & Cregg, 1998). El sistema de expresión utilizando vectores con el promotor de la enzima Alcohol Oxidasa 1 (pAOX1) es de particular importancia en el presente trabajo, por lo que se describirá con más detalle. Así mismo, cada vector tiene características diversas que lo hacen diferente a los demás, tales como, sitios específicos de restricción, control del gen heterólogo con otros promotores, selección con antibióticos, fusión de la proteína heteróloga a secuencias que facilitan la secreción y purificación de la misma. Estas características se describen a detalle para cada vector en la tabla I.

Tabla IVectores de expresión comunes para *P. pastoris* (Higgins y Cregg, 1998).

Vector de expresión	Marcador de selección	Características
pHIL-D2	<i>HIS4</i>	Sitios de corte <i>NotI</i> para reemplazo génico de <i>AOX1</i>
pAO815	<i>HIS4</i>	Sitios de corte delimitado por <i>BamHI</i> y <i>BglIII</i> para generación de multicopias
pPIC3K	<i>HIS4</i> y <i>kan^r</i>	Selección por el antibiótico kanamicina, sitio múltiple de restricción
pPICZ	<i>ble^r</i>	Selección por el antibiótico Zeocina, fusión de la proteína heteróloga a una cola de His
pHOW10	<i>HIS4</i>	Expresión controlada por el promotor p <i>GAP</i>
pGAPZ	<i>ble^r</i>	Expresión controlada por el promotor p <i>GAP</i> , sitio múltiple de restricción, Selección por el antibiótico Zeocina, fusión de la proteína heteróloga a una cola de His
pHIL-S1	<i>HIS4</i>	Promotor <i>AOX1</i> acoplado a el factor de secreción <i>PHO1</i> , sitios <i>XhoI</i> , <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> disponibles para inserción
pPIC9K	<i>HIS4</i> y <i>kan^r</i>	Promotor <i>AOX1</i> acoplado a factor de secreción α -MF, sitios <i>XhoI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> , <i>SnaBI</i> y <i>AvrII</i> para inserción.
pPICZ α	<i>ble^r</i>	Promotor <i>AOX1</i> acoplado a factor de secreción α -MF, sitio múltiple de restricción, generación de multicopias, selección por zeocina, fusión de la proteína heteróloga a una cola de His
pGAPZ α	<i>ble^r</i>	Expresión del gen heterólogo controlada por p <i>GAP</i> acoplado a factor de secreción α -MF, sitio múltiple de restricción, selección por zeocina, fusión de la proteína heteróloga a una cola de His

4.1.1.2 Vectores de expresión acoplados al promotor pAOX1

A pesar de la gran variedad de vectores de expresión que existen en *P. pastoris*, los vectores de expresión basados en el promotor del gen de la enzima alcohol oxidasa I (AOX I), inducidos con metanol, han sido ampliamente usados respecto a otros tipos tales como los vectores que usan pGAP (Macauley *et al.*, 2005), debido a diversas ventajas presentes en estos, tales como: transcripción del gen heterólogo fuertemente regulada y controlada por el promotor mediante un mecanismo de represión/des-represión, la represión de la transcripción por fuentes de carbono tales como el glicerol ó la glucosa permite llevar acabo etapas largas de crecimiento celular previo a la inducción, inducción sencilla añadiendo metanol (Macauley *et al.*, 2005).

4.1.1.3 Metabolismo de metanol y promotores de las enzimas Alcohol oxidasa I y II (pAOX1 y pAOX2)

La capacidad de esta levadura para consumir metanol como fuente de carbono está dada por las dos enzimas alcohol oxidasa (AOX I y II) siendo AOX I la responsable de la mayoría de esta actividad en la célula. Las AOX I y II se sintetizan en grandes cantidades dentro de la célula (hasta un 30% de las proteínas intracelulares solubles), cuando *P. pastoris* se cultiva en presencia de metanol como única fuente de carbono en el medio de cultivo (Cereghino & Cregg, 2000; Li *et al.*, 2007). La síntesis de las enzimas alcohol oxidasa I y II está dada a la expresión de sus dos genes, el AOX1 y AOX2 respectivamente. Las regiones codificantes de estos dos genes presentan una similitud en su secuencia nucleotídica del 90% (Creeg *et al.*, 1989), sin embargo las regiones promotoras de los genes AOX son distintas entre sí. El promotor pAOX del gen AOX se induce cuando el metanol se encuentra en el medio de cultivo. Durante el estado inducido por metanol la enzima AOX I es responsable de la mayoría de la actividad Alcohol oxidasa presente en la célula (Cregg *et al.*, 1989), siendo su promotor, más importante para la expresión de la Alcohol oxidasa. Al ser el promotor pAOX1 del gen, un promotor fuerte y regulable, se ha utilizado para la construcción de vectores para la producción de diversas proteínas heterólogas. Por el contrario el pAOX2 conduce a una

menor expresión de la alcohol oxidasa en la célula, sin embargo su presencia puede indicar una ventaja competitiva en ciertas circunstancias (Cregg *et al.*, 1989). En sistemas de expresión basados en el *pAOXI*, se integra al genoma de *P. pastoris*, la secuencia codificante del gen de la proteína heteróloga que se busca producir, bajo el control del *pAOXI*, logrando así la inducción del gen y la producción de la proteína heteróloga al momento de cultivar la levadura con metanol (Higgins y Cregg, 1998).

4.1.1.4 Secreción de la proteína heteróloga

Usando *P. pastoris*, las proteínas heterólogas se pueden expresar intracelular o extracelularmente en el medio de cultivo. El uso de secuencias señal para la secreción de proteínas heterólogas al medio de cultivo ha sido ampliamente reportado en *P. pastoris* (Cereghino & Cregg, 2000; Sreekrishna *et al.*, 1997). El péptido mas usado para este fin es el de la secuencia prepro del factor α de apareamiento de *S. cerevisiae* (Sreekrishna, 2010; Higgins & Cregg, 1998). La secreción de proteínas heterólogas utilizando este péptido acoplado al proteína consiste de tres pasos: el primero es la eliminación de la región "pre" por la enzima señal-peptidasa; después la proteasa *KEX2* hace un corte proteolítico en la región "pro" justo después de una lisina-arginina y ácido glutámico, y finalmente son removidas las repeticiones Glu-Ala en el extremo N-terminal por acción de la dipeptidil-aminopeptidasa (*Ste13*) (Figura 1). La eficiencia en cada paso está altamente ligada a la secuencia de la proteína madura, así como a la estructura terciaria que adopta. En la mayoría de los casos, el uso de esta secuencia señal resulta en una secreción más eficiente que el uso de la secuencia señal nativa de la proteína heteróloga (Cereghino & Cregg, 2000).

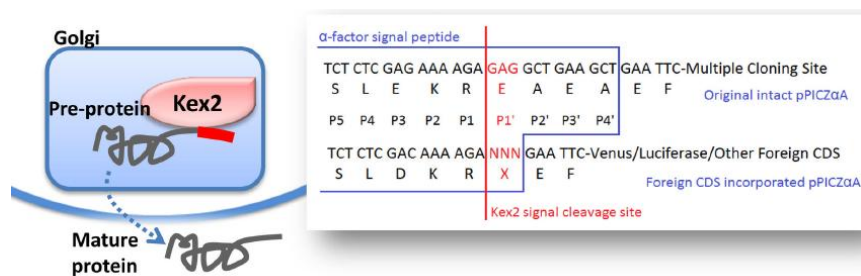


Figura 1. Papel de la enzima *KEX2* en el corte del péptido señal del factor alfa de *S. cerevisiae* en *P. pastoris* (Yang *et al.* 2013).

Tabla II

Cepas de *P. pastoris* utilizadas para expresión de proteínas heterólogas.
(Higgins y Cregg, 1998).

Cepa	Genotipo	Fenotipo	Características
Y-11430	Wild-type	NRRL (nativa)	Nativas
GS115	<i>his4</i>	Mut ⁺ , His ⁻	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina
KM71	<i>aox1Δ::SARG4</i> <i>his4 arg4</i>	Mut ^s , His ⁻	Consumo de metanol bajo, auxótrofa a histidina
MC100-3	<i>aox1Δ::SARG4</i> <i>Aox2Δ::phis4</i> <i>his4 arg4</i>	Mut ⁻ , His ⁻	Incapaz de consumir metanol, auxótrofa a histidina
SMD1168	<i>pep4 Δ his4</i>	Mut ⁺ , His ⁻ , deficiente de proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce la Proteinasa A
SMD1165	<i>prb4 his4</i>	Mut ⁺ , His ⁻ , deficiente de proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce la Proteinasa B
SMD1163	<i>prb4 pep4 his4</i>	Mut ⁺ , His ⁻ , deficiente de proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce la Proteinasa B, Proteinasa A ni Carboxipeptidasa Y

4.1.1.5 Cepas de *P. pastoris* para la expresión de proteínas heterólogas

Todas las cepas de *P. pastoris* utilizadas para la expresión de proteínas heterólogas fueron derivadas de la cepa nativa NRRL-Y 11430. La mayoría tienen mutaciones en *HIS4* que las hace incapaces de sintetizar el aminoácido histidina (Higgins & Cregg, 1998). Todas estas cepas presentan distintos fenotipos adquiridos por mutación o delección de genes. La tabla II describe más detalladamente algunas de las

cepas y sus características especiales respecto a estos fenotipos. El fenotipo de utilización de metanol (Mut) es de particular importancia para el presente trabajo, por lo cual se describe con más detalle.

4.1.2 Fenotipo de utilización de metanol (Mut)

Las cepas recombinantes de *P. pastoris* se clasifican en tres grupos respecto al fenotipo de utilización de metanol (Mut): las cepas Mut⁺ (crecimiento en metanol tipo nativa), las cuales portan los genes *AOX1* y *AOX2* intactos y funcionales en; las cepas Mut^s (crecimiento en metanol menor que tipo nativa), en las cuales sólo el gen *AOX2* se encuentra intacto y funcional; el último grupo lo componen las cepas Mut⁻ (Crecimiento en metanol nulo), en las cuales tanto el gen *AOX1* como el gen *AOX2* se encuentran inactivados y por lo tanto no pueden utilizar el metanol como fuente de carbono y energía. Estas tres cepas se encuentran disponibles comercialmente y se derivan todos de la misma cepa original, aunque tienen una velocidad específica de crecimiento diferente en presencia de metanol. Estas tres cepas se distinguen por sus velocidades de crecimiento en presencia de metanol: Mut⁺: (0.14 h⁻¹), Mut^s (0.04 h⁻¹), and Mut⁻ (0.0 h⁻¹) (Stratton *et al.*, 1998).

4.1.3 Bioprocesos con *P. pastoris*

El escalamiento de bioprocesos en *P. pastoris* de matraz agitado a biorreactor incrementa la producción de la proteína heteróloga hasta 10 veces (Li *et al.*, 2007). Esto, principalmente, se debe a la capacidad que tiene *P. pastoris* para crecer a densidades celulares altas cuando se cultiva en biorreactor, además de que parámetros tales como la temperatura, la aeración, el pH y la alimentación de la fuente de carbono son controlados en línea. (Cereghino *et al.*, 2002). Típicamente, un bioproceso en biorreactor con *P. pastoris* se compone de tres etapas: una etapa de lote (*batch*) con glicerol como fuente de carbono seguida de una etapa de lote alimentado con glicerol (*fed-batch*) para posteriormente llevar a cabo una etapa de inducción con lote alimentado de metanol (Figura 2). Durante estas dos primeras etapas de lote y lote alimentado con glicerol se permite al cultivo crecer a una velocidad de crecimiento máxima, no estando

restringida la fuente de carbono, esto con el objetivo de obtener una alta densidad celular para iniciar la posterior la fase de inducción, durante la cual se produce y secreta al medio de cultivo la proteína heteróloga (Cereghino *et al.*, 2002; Stratton *et al.*, 1998). El glicerol tiene un efecto menos represor sobre el promotor *AOX* que otras fuentes de carbono como la glucosa, por esto, generalmente, se utiliza el glicerol para el aumento de la densidad celular (Li *et al.*, 2007; Romanos, 1995).

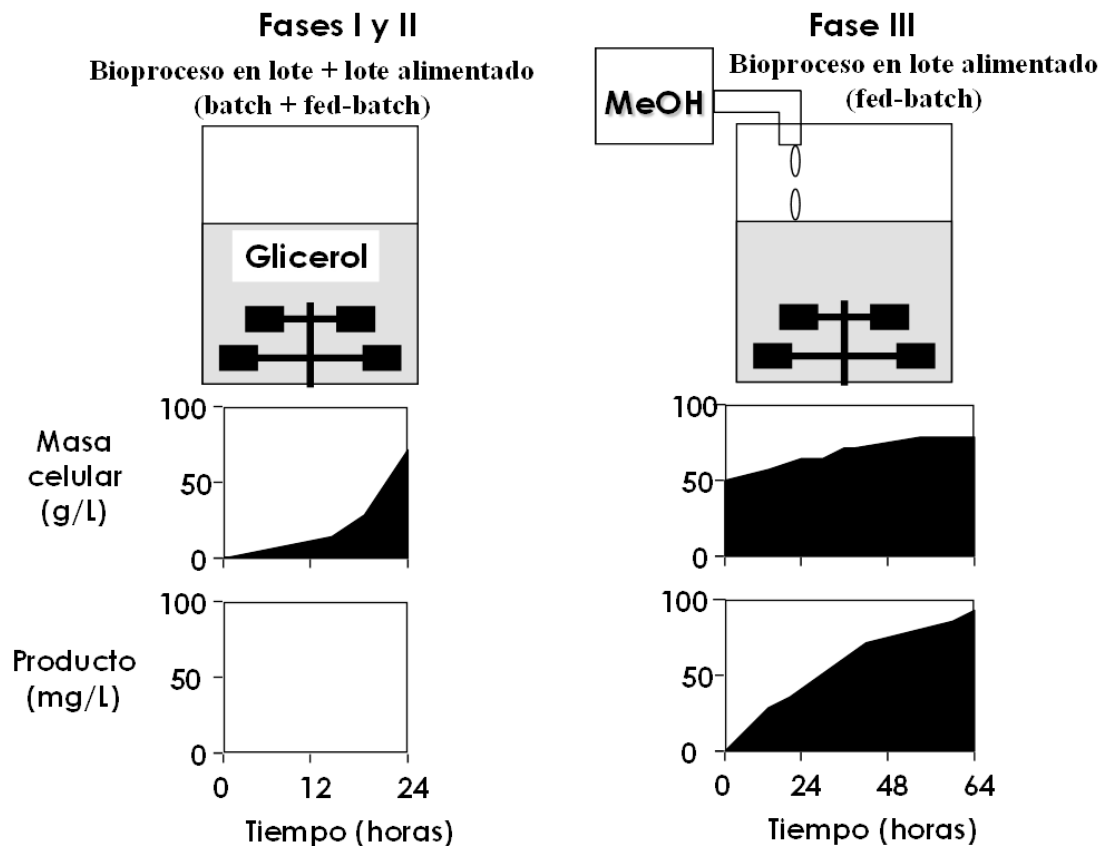


Figura 2. Etapas de un bioproceso de producción de proteínas heterólogas con la levadura *P. pastoris*.

Entre las tres etapas, la inducción con metanol es la más importante para el diseño de una fermentación con *P. pastoris* dado que de esta fase depende la producción de la proteína heteróloga y el éxito del bioproceso. Durante esta etapa, debido al metabolismo del metanol se generan subproductos tóxicos como el formaldehído, el formiato y el peróxido de hidrógeno los cuales se acumulan dentro de la célula en los

peroxisomas. Cuando una célula muere y se produce lisis celular, estos productos tóxicos se liberan al medio de cultivo acumulándose en éste y causando toxicidad a las células del cultivo. Por esta razón es de gran importancia determinar una velocidad de adición de metanol durante la etapa de inducción que mantenga en equilibrio la toxicidad de los subproductos del metabolismo del metanol y la producción de la proteína heteróloga (Cregg *et al.*, 2000; Romanos, 1995).

La estrategia de control del metanol se puede llevar a cabo de dos maneras, la primera, llamada “open loop” que se lleva determinando la concentración de metanol y realizand las correcciones para cuplir con especificaciones establecidas de forma manual , comúnmente esto lleva a un control impreciso de este parámetro a lo largo del cultivo. Por otro lado, la estrategia llamada de “close loop” está basada realizar un control automatizado de la concentración de metanol mediante la detección del metanol en línea con el proceso, para lo cual se requiere de instrumentación adecuada que en momento dado puede limitar el escalamiento (Sreekrishna, 2010; Valero 2013).

El control de los parámetros en los bioprocesos con *P. pastoris* es clave para lograr producciones altas de proteínas heterólogas. Invitrogen, proporciona un manual completo para llevar a cabo estos bioprocesos (Invitrogen 2002), en el cual se detallan estrategias para el control del bioproceso, dependiendo del fenotipo de la levadura. El control de parámetros se puede llevar a cabo de tres formas: En línea, en continuo y en discontinuo. Se considera un parámetro controlado en línea como aquel que es detectado y regulado *in situ* por un sistema automatizado de control, basado en un valor consigna, se recomienda que parámetros clave para el control del bioproceso, tales como la temperatura, el pH, la agitación y la fuente de alimentación sean controlados por este medio. Un parámetro controlado en continuo es aquel que es registrado al momento del bioproceso, no directamente del medio de cultivo, utilizando cálculos u otras determinaciones analíticas que posteriormente permitirán tomar una decisión al respecto del bioproceso, parámetros tales como la cantidad de células, alguna fuente adicional de carbono, nitrógeno u otro nutriente así como la supresión de parámetros que van en detrimento del proceso, tales como el exceso de espuma, altas presiones, etc. Por último un análisis en discontinuo es aquel que se lleva a cabo para determinar parámetros que no son vitales para el control del proceso, que sin embargo resultan interesantes para la

posterior evaluación del mismo, parámetros tales como la producción de la proteína heteróloga, la actividad de algún metabolito secundario, proteasas, consumo total de nutrientes, etc. Estas determinaciones no permiten modificar el proceso sobre la marcha, pero otorgan un panorama general para las modificaciones que se deben hacer para el siguiente bioproceso. En la figura 3 se representa en amplio margen el control con el cual se lleva a cabo un bioproceso con *P. pastoris*.

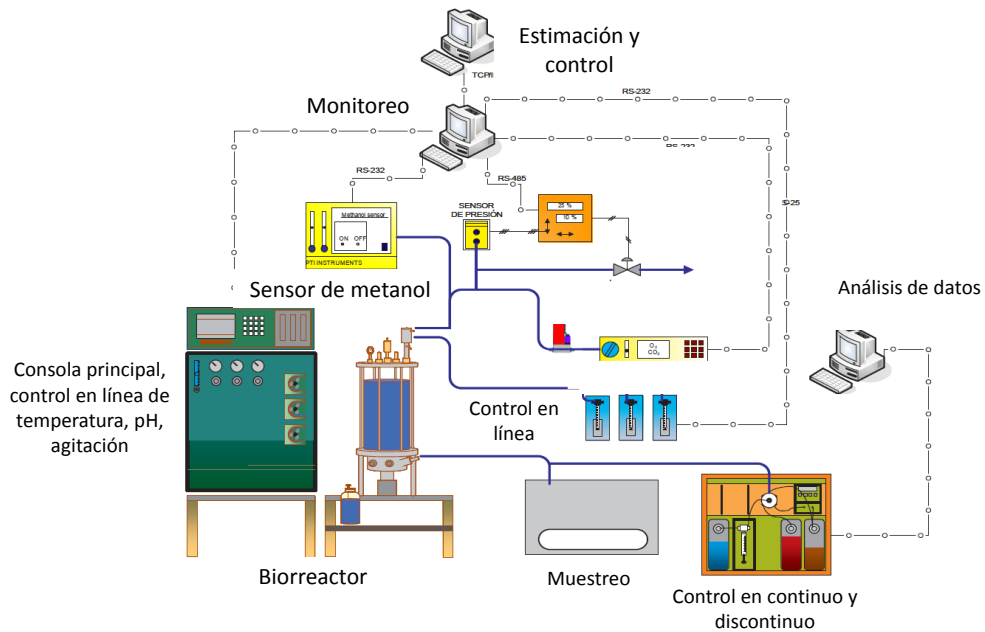


Figura 3. Control del bioproceso con *P. pastoris* (Valero, 2013).

4.2 Efecto y optimización de condiciones de cultivo para producción de proteínas heterólogas en bioprocesos con *P. pastoris*

El uso de una estrategia adecuada durante el cultivo en biorreactor con *P. pastoris* puede determinar la diferencia entre una alta ó una baja producción. Existen diversos factores ambientales que interactúan tanto en el metabolismo de la levadura como en la producción de proteínas heterólogas (Li *et al.*, 2007). Estos factores pueden clasificarse en tres por su origen: químicos, tales como la composición del medio de cultivo, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, pH del medio de cultivo; físicos, como la temperatura y la aeración del medio de cultivo; e inherentes al microorganismo como la biomasa inicial al momento de la inducción, fenotipo Mut, capacidad de secreción de

la proteína heteróloga. Todos ellos (excepto por el fenotipo Mut y la secreción mencionados en el punto 4.1) se describen con más detalle a continuación.

4.2.1 La temperatura en los cultivos de *P. pastoris*

Cuando se estudia un bioproceso para la producción de proteínas se debe tener en cuenta que la temperatura óptima de crecimiento celular no siempre será equivalente a la temperatura óptima de producción de la proteína (Bayraktar, 2009). Además, las proteínas sobreproducidas en el retículo endoplásmico pueden plegarse incorrectamente a altas temperaturas generando degradación del producto recombinante y estrés del organismo hospedero por la sobrecarga metabólica, por lo que optimizar una temperatura puede incrementar significativamente la producción (Li *et al.*, 2007) y además reducir el estrés y la formación de sub-productos tóxicos debido a éste (Sreekrishna, 2010).

La temperatura estándar para un cultivo de *P. pastoris* indicada por el manual de la compañía Life Technologies, antes Invitrogen (Invitrogen, 2002) es de 30°C. El primer estudio fisiológico de la levadura *P. pastoris* aislada de suelo (cepa CBM10) indicó que la temperatura ideal de crecimiento para este organismo es de 30°C con una velocidad específica de crecimiento de 0.235 h⁻¹ en metanol (Jara *et al.*, 1983). Esta temperatura de cultivo sería luego reportada por diversos autores y protocolos de cultivo para *P. pastoris* (Stratton *et al.*, 1998; Hollemberg and Gellissen 1997; Invitrogen 2002).

Por todo lo anterior, a pesar de lo ya conocido acerca de la temperatura de crecimiento de *P. pastoris*, en la última década han surgido trabajos que prueban temperaturas de cultivo por debajo de 30°C durante la etapa de inducción con el fin de incrementar la producción de proteínas heterólogas. Cultivando a 23°C durante la inducción se logró aumentar de 10 veces la producción de proteína heteróloga anticongelante tipo II en cepas SMD1168 (Li *et al.*, 2001). Así mismo, otro reporte indicó que al bajar la temperatura gradualmente de 30 hasta 13°C durante la etapa de inducción con metanol aumenta la producción de la proteína heteróloga hasta el doble, en cepas SMD1168 (Jahic *et al.*, 2003b). Así entonces, esta tendencia de cultivos a baja temperatura ha incrementado en los años más recientes con resultados similares

(Fredericks *et al.*, 2010; Damasceno *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2004; Dragosits *et al.*, 2011, Gasser *et al.*, 2007; País-Chanfrau *et al.*, 2004).

Sin embargo, no siempre una temperatura baja produce el mejor resultado en producción. Trabajando con cepas X-33, se encontró mayor producción de un inhibidor de tripsina a 28°C que a 24 y 26°C, además el autor indica también una velocidad específica de crecimiento mayor a 28°C (Yang *et al.*, 2008). Por otro lado, en cepas KM71H no se logró obtener un incremento significativo (sólo 1.15 veces) de la secreción de interferón porcino recombinante disminuyendo la temperatura de 30 a 20°C (Jin *et al.*, 2011). Estos resultados indican la necesidad de buscar, no sólo bajar la temperatura para incrementar la producción, sino también buscar una temperatura óptima para la producción de proteínas entre el rango de 30° y 20°C.

Respecto al efecto de la temperatura de inducción sobre el metabolismo de *P. pastoris*, algunos autores han formulado distintas hipótesis. Por una lado hay trabajos que indican que al disminuir la temperatura durante la etapa de inducción, el estrés metabólico del organismo hospedero también baja y a su vez se liberan menos proteasas al medio de cultivo, disminuyendo la degradación proteolítica de las proteínas heterólogas libres en el medio de cultivo (Jahic *et al.*, 2003b; Li *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2011). Se ha demostrado también que al disminuir la temperatura de inducción aumenta el plegamiento adecuado de las proteínas en el retículo endoplásmico y a su vez la secreción de estas proteínas se vuelve más eficiente (Gasser *et al.*, 2008; Gasser *et al.*, 2007). También se sugiere que la disminución de la temperatura de inducción mejora la adaptación de *P. pastoris* durante la etapa de inducción ligado a una actividad metabólica mayor (Jin *et al.*, 2011).

En conclusión, las temperaturas de inducción por debajo de 30°C, incrementan la producción de proteínas heterólogas la mayoría de las veces, incremento, a su vez provocado, por la combinación de la disminución del estrés metabólico, la secreción de proteasas y el incremento de la secreción de proteínas.

4.2.2 Aeración y control del oxígeno disuelto

P. pastoris es un organismo aeróbico estricto, que necesita altas cantidades de oxígeno cuando crece en metanol. El oxígeno molecular no sólo es usado para la respiración celular en la mitocondria, sino también en la oxidación del metanol a formaldehído por la enzima alcohol-oxidasa, generando dos subproductos tóxicos como lo son el formaldehído y el peróxido de hidrógeno (Bayraktar, 2009). En los bioprocesos con *P. pastoris* el oxígeno disuelto generalmente se mantiene en valores por arriba de 20-30% (Bayraktar, 2009; Sreekrishna, 2010; Li *et al.*, 2007; Stratton *et al.*, 1998; Cereghino *et al.*, 2002) esto debido a que *P. pastoris* no presenta rutas de fermentación por lo que el oxígeno debe estar siempre presente para evitar estrés y muerte celular (Cereghino *et al.*, 2002).

Para optimizar este factor pueden aplicarse tres enfoques, el primero es administrar mayor o menor flujo de aire hacia el biorreactor, sin embargo no se recomienda que la aeración sea mayor a 1 vvm, (Stratton *et al.*, 1998), el segundo consiste en aumentar la agitación, aumentando a su vez la solubilidad del oxígeno en el medio y la tercera enriquecer el aire mezclando oxígeno puro.

Existen algunos estudios que indican una relación de la concentración de oxígeno disuelto con la producción de proteínas heterólogas. Probando diferentes rangos de concentración de oxígeno disuelto, se encontró una mayor producción de péptido inhibidor de elastasa cuando la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en un rango de 30-50% que a un rango de 10-50% (Lee *et al.*, 2003). También se encontró mayor producción de xilanasa recombinante a 250 rpm de agitación entre un rango de 50 a 350 rpm (Zhou *et al.*, 2007).

4.2.3 El pH en los cultivos de *P. pastoris*

P. pastoris tolera un rango de pH que va de 3.0 a 7.0 (Sreekrishna *et al.*, 1997) teniendo su pH óptimo entre 3.5 y 5.5. El pH de cultivo para los bioprocesos con *P. pastoris* es altamente dependiente de la naturaleza de la proteína recombinante, por lo tanto, se deben tener en cuenta que para optimizar este parámetro, no sólo se debe considerar la tolerancia del pH del cultivo de esta levadura, sino también la estabilidad

de la proteína heteróloga (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Además, en los bioprocesos con esta levadura se busca cultivar a pH con tendencia a la acidez, con el objetivo de disminuir la producción de proteasas por parte de la levadura, tales proteasas pueden degradar sustancialmente la proteína recombinante producida (Gasser *et al.*, 2008; Sreekrishna 2010). Sin embargo, los valores de pH ácidos pueden provocar que la célula active mecanismos de estrés para mantener el pH interno adecuado para su metabolismo, este estrés también puede disminuir el rendimiento del producto recombinante.

Diversos trabajos estudian el efecto del pH en la producción de cultivos de *P. pastoris*. En un estudio del efecto de cuatro valores de pH (4.5, 5.5, 6.0 y 6.5) se encontró que la mayor producción de hormona de crecimiento de carpa se llevo a cabo a pH 6.0, y a pH de 4.5 no se observo producción (Li *et al.*, 2003). Por otro lado, se encontró la mayor producción de una Xilanasa a pH 6.5 probando un rango desde 3.0 a 7.2. Sin embargo, los autores concluyen que este pH óptimo es dependiente de la proteína mas no de la cepa (Zhou *et al.*, 2007). En un caso opuesto, se obtuvo mayor producción de esta proteína de fusión cultivando a pH 4.0 en vez de a 5.0, se indica que esto se debe a una mayor estabilidad de la proteína en el medio de cultivo debido a una menor producción de proteasas (Jahic *et al.*, 2000a). Por último, se encontró un valor óptimo de pH de 5.0 para la producción de hormona de crecimiento humana probando en un rango de 4.5 a 6.0 (Calik *et al.*, 2010).

Sin lugar a dudas, dado lo anterior, el pH es uno de los factores más importantes y más complicados de optimizar para obtener la mayor producción posible de la proteína heteróloga.

4.2.4 Concentración de metanol en el medio de cultivo

La concentración de metanol es uno de los parámetros más importantes a optimizar dentro de un bioproceso con *P. pastoris*, su concentración debe mantenerse a niveles limitantes (Stratton, 1998). Debido al consumo de metanol que presentan las cepas Mut^s, se ha pensado que a altas concentraciones de metanol ocurre un mayor efecto inductor, además de un metabolismo menor y baja toxicidad debida al metanol, de acuerdo a diversos reportes en los que se presentan producciones óptimas a

concentraciones altas de metanol (Wan *et al.*, 2011; Colao *et al.*, 2006; Damasceno *et al.*, 2004) así también existen trabajos que reportan su producción óptima a bajas concentraciones de metanol (Jafari *et al.* 2011; Jin *et al.*, 2011), incluso hay trabajos que no observan un efecto marcado de este parámetro sobre la producción (Damaso *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2007).

Para administrar el metanol en un bioproceso con *P. pastoris* se utilizan dos tipos de estrategias, la primera consiste en mantener la velocidad específica de crecimiento constante modificando la concentración de metanol (Arnau *et al.*, 2010; Cos *et al.*, 2005) y la segunda en mantener la concentración de metanol constante a lo largo del cultivo (Huang *et al.*, 2011; Viader-Salvadó *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2011). Estas dos estrategias provocan un comportamiento metabólico distinto en la levadura, cuando se busca mantener la velocidad específica de crecimiento constante, generalmente se administra metanol en exceso, lo que a su vez produce compuestos tóxicos como el formaldehído y peróxido de hidrógeno (ver punto 4.1.3). Por el otro lado, mantener la concentración de metanol constante puede provocar limitación de la fuente de carbono y energía para la levadura acelerando el estrés metabólico y produciendo muerte y lisis celular.

Todo lo mencionado anteriormente, hace de la estrategia de alimentación metanol uno de los parámetros más importantes dentro de la optimización de la producción en cultivos de *P. pastoris*.

4.2.5 Densidad celular al inicio de la inducción

Tradicionalmente, se cree que a mayor biomasa al inicio de la inducción, se tienen mayores rendimientos en la producción de proteínas heterólogas. El objetivo de hacer un lote alimentado con glicerol previo a la etapa de inducción es el de producir una alta cantidad de biomasa para posteriormente inducirla con metanol (Sreekrishna 2010). Ésto además es confirmado por algunos reportes que muestran la influencia de la optimización de este parámetro en la producción de proteínas heterólogas.

Se obtuvo una mayor producción de β -galactosidasa recombinante iniciando a 320 g/L de peso húmedo la fase de inducción, en vez de a 120 y 220 g/L de peso húmedo inicial, sin embargo el autor concluye que al iniciar con mayor biomasa la etapa

de inducción, se obtuvo mayor producción en menor tiempo de inducción (Plantz *et al.*, 2006). Por otro lado, iniciando la etapa de inducción a una densidad celular DO_{600} de 64 se obtuvo una mayor producción de proteína verde fluorescente recombinante que a densidades de 61 y 28, el autor concluye que esto podría deberse a una menor acumulación residual de metanol cuando el cultivo inicia su inducción con mayor biomasa (Holmes *et al.*, 2009).

4.2.6 Fuente de carbono adicional al metanol

Como se mencionó anteriormente, durante la etapa de inducción, el metanol se cumple dos funciones, la primera como inductor del gen heterólogo y la segunda como fuente de carbono y energía para la levadura. Sin embargo no es la mejor fuente de energía, esto es debido a que su oxidación genera sub-productos tóxicos y al ser una molécula de un solo carbono resulta menos eficiente que otras fuentes de energía como la glucosa, glicerol ó el sorbitol. Una estrategia para incrementar la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* es el uso de fuentes de carbono adicionales al metanol, esto, incrementa la biomasa durante la inducción y disminuye el tiempo que dura la misma. (Sreekrishna, 2010).

Esta estrategia generalmente se emplea con cepas de fenotipo Mut^s debido a que presentan crecimiento muy bajo durante la etapa de inducción con metanol. En un estudio muy completo al respecto, se comparó el efecto de distintas fuentes de carbono en la producción y crecimiento de cepas Mut^- de *P. pastoris* y se encontró que glicerol, glucosa, etanol y acetato reprimieron al expresión de la proteína heteróloga β -Galactosidasa y por el contrario, alanina, manitol, sorbitol y trehalosa no reprimieron la expresión de β -Galactosidasa (Inan *et al.*, 2001). Resultados parecidos se obtuvieron en un trabajo posterior utilizando cepas con fenotipo Mut^s (Xie *et al.*, 2005).

Por lo tanto, el uso de alimentación mixta con sorbitol ha sido una de las estrategias más usadas para incrementar la producción de proteínas en bioprocesos con *P. pastoris*. Además de incrementar la producción de lipasa recombinante 2.2 veces en cepas Mut^s de *P. pastoris*, se encontró que el sorbitol reduce el estrés metabólico de la

levadura durante la inducción con metanol (Ramón *et al.*, 2007) y así se han obtenido resultados parecidos en diversos trabajos (Inan *et al.*, 2001; Jungo *et al.*, 2007).

4.2.7 Fuente de nitrógeno

El nitrógeno es un micronutriente esencial para los organismo así como un componente principal en las proteínas, típicamente, la fuente de nitrógeno utilizada en bioprocesos con *P. pastoris* es el hidróxido de amonio (NH₄OH), que además se utiliza para equilibrar el pH del cultivo (Cos *et al.*, 2006), ya que *P. pastoris* tiende a acidificar el medio de cultivo y el NH₄OH al ser una base lo compensa. Actualmente solo hay un estudio que relaciona la optimización de la adición de NH₄OH con el aumento de la producción de proteínas heterólogas, encontrando la máxima producción a 0.4 M de NH₄OH y concluyendo que una concentración mas alta de este parámetro provoca un decremento en la producción (Yang *et al.*, 2004).

Una estrategia más adecuada para administrar cantidades altas de nitrógeno, es la de administrar fuentes adicionales al NH₄OH, tales como sulfato de amonio o hidrolizados de proteínas como cas-aminoácidos, extracto de levadura ó peptona de carne. Estudios recientes demuestran una relación directa en el uso de fuentes de nitrógeno adicionales al hidróxido de amonio que mejoran la producción de proteínas heterólogas, disminuyendo la proteólisis en el medio de cultivo. Administrando Cas-aminoácidos y sulfato de amonio se incrementó la producción de Interferon T recombinante y se disminuyó la concentración de diversas proteasas vacuolares en el medio de cultivo libre de células (Sinha *et al.*, 2005). En un resultado similar, se encontró una producción 3.5 veces mayor de una fitasa recombinante en cepas Mut^s adicionando sulfato de amonio y extracto de levadura (Chen *et al.*, 2004).

4.2.8 Efectos multifactoriales de las condiciones de cultivo

En resumen de lo anterior, la estrategia de alimentación de metanol es crucial en bioprocesos con *P. pastoris*, dado a que el metanol es inductor del gen heterólogo y el metabolismo de este produce sub-productos tóxicos (Stratton *et al.*, 1998). Temperaturas bajas de cultivo incrementan la producción de proteínas recombinantes mejorando la

viabilidad celular y disminuyendo la secreción de proteasas (Sreekrishna 2010; Li *et al.*, 2001; Jahic *et al.*, 2003b; Wang *et al.*, 2009), así mismo, se ha demostrado la mejora en el plegamiento de proteínas y el incremento en la secreción cuando se cultiva *P. pastoris* a baja temperatura (Dragosits *et al.*, 2009). El pH puede prevenir la degradación por proteasas e incrementar la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* (Sreekrishna, 2010), sin embargo algunos reportes indican valores de pH cercanos a 4 para disminuir la proteólisis (Jahic *et al.*, 2003b), otros autores recomiendan un pH por arriba de este valor para prevenir el mismo problema (Kobayashi *et al.*, 2001). Se ha reportado que fuentes de carbono adicionales al metanol (como glicerol ó sorbitol) son útiles para incrementar la producción de proteínas heterólogas, sobretodo en cepas Mut^s (Cos *et al.*, 2006), además disminuye el tiempo de inducción, y aumenta la densidad celular (Ramón *et al.*, 2007). Además el sorbitol ha sido usado para sobreponer la toxicidad de la proteína recombinante en la célula hospedera (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2009) ó bien para disminuir el estrés metabólico caudado por la producción de la proteína heteróloga (Ramón *et al.*, 2007). La densidad celular al inicio de la inducción ha mostrado ser importante para maximizar la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*, donde típicamente la producción y la densidad celular son directamente proporcionales (Cereghino *et al.*, 2000).

A pesar del conocimiento del impacto que las condiciones de cultivo tienen en la producción de la proteína heteróloga en *P. pastoris*, estas están pobremente caracterizados (Mattanovich *et al.*, 2004). Claramente algunos factores influncian a otros y varios de ellos podrían influnciar el mismo parámetro fisiológico. La concentración de metanol, fuentes de carbono adicionales y la temperatura tienen influencia en el crecimiento celular, a su vez el crecimiento celular influncia la demanda de metanol, que a su vez, junto con la temperatura y fuentes de carbono adicionales influncian el estrés metabólico. La temperatura influncia la secreción de proteínas y junto con el pH influncian la estabilidad de las proteínas, lo que al final afecta la producción del proceso global.

4.3 Diseños experimentales multifactoriales y producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*

Dado lo mencionado anteriormente para bioprocesos con *P. pastoris* (punto 4.2.8), y a que en general, la eficiencia de los procesos biológicos esta sometida a la influencia de numerosos factores y su interacción, la optimización conjunta de estos factores utilizando diseños experimentales multifactoriales proporciona un enfoque adecuado para su control y entendimiento. El diseño de experimentos multifactorial prueba la influencia de dos o más factores sobre una variable respuesta y reduce la cantidad de experimentos a realizar para llegar a una conclusión. Por esta razón el diseño de experimentos representa una alternativa a la metodología tradicional de variar un factor a la vez. (Bora *et al.*, 2012).

Previamente, este enfoque experimental ha sido utilizado para medir la influencia de factores ambientales en bioprocesos con *P. pastoris* (Bora *et al.*, 2012). En cepas de *P. pastoris* Mut⁺ se encontró una máxima producción de proteína verde fluorescente (3.5 g/L) variando la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno disuelto en un total de trece experimentos utilizando un diseño de superficie respuesta (Holmes *et al.*, 2009). Utilizando el mismo diseño experimental, en cepas Mut⁺ se logró una producción máxima combinando ocho variables de la composición química del medio de cultivo en doce experimentos (Aizemberg *et al.*, 2009). Utilizando un diseño factorial completo, en un total de siete experimentos combinando tres distintas fuentes de nitrógeno se logró una producción máxima de cistatina humana C en cepas Mut^s (Pritchett *et al.*, 2005). Combinando tres factores ambientales se obtuvo una producción máxima de 0.2 g/L de mini-proinsulina humana en cepas Mut^s haciendo 6 experimentos, aunque no se menciona algún diseño experimental para este reporte (País-Chanfrau *et al.*, 2004). En otro reporte, una producción máxima de 0.2 g/L de xilanasa recombinante se alcanzó en 8 experimentos modificando la densidad celular inicial, concentración de metanol y YNB en un diseño factorial 2³ (Damaso *et al.*, 2003). Por último, mediante un diseño de superficie de respuesta se logró una producción máxima de eritropoyetina recombinante combinando pH, temperatura y oxígeno disuelto (Bora *et al.*, 2012).

4.4 Optimización de sistemas de producción por el Método de optimización Simplex

Una manera de abordar el problema multifactorial que representa un bioproceso industrial de producción de proteínas heterólogas sería, como se ha mencionado anteriormente (ver punto 4.3), abordar la optimización de los factores del bioproceso con un diseño experimental multifactorial, que además permita tener los factores del bioproceso optimizados en el menor número de ensayos necesarios.

Una alternativa para abordar esta problemática es el método de optimización Simplex, que ha probado ser una técnica eficiente en el desarrollo e implementación de procesos y métodos químicos (Shavers *et al.*, 1979). El método simplex secuencial es un proceso de optimización empírica que se puede aplicar cuando la respuesta a obtener depende de la optimización de factores continuos (cuantitativas). La utilidad del método aumenta proporcionalmente con el número de factores involucrados y permite alcanzar una respuesta óptima de manera eficiente (Nelder & Mead, 1965).

El diseño experimental es sencillo, consiste en diseñar $n+1$ ensayos iniciales donde n es el número de factores a optimizar que influyen en la variable respuesta a obtener. A los factores seleccionados se les asignan dos niveles de acuerdo a la información obtenida ya sea en ensayos previos o de la literatura. Con estos niveles se diseña el primer grupo de ensayos y se acomodan en una matriz de diseño factorial fraccionado para posteriormente llevar a cabo los ensayos de acuerdo a esta matriz. Después se identifica y se elimina el ensayo que produjo el peor nivel de la variable respuesta y después para cada factor se diseñan nuevos niveles y se obtiene un nuevo ensayo con la combinación de esos niveles. Se realiza el nuevo ensayo, se identifica el peor nivel de la variable respuesta y se continúan diseñando ensayos hasta alcanzar la variable respuesta óptima. Además recientemente se han desarrollado diversos análisis estadísticos para pruebas de hipótesis sobre las variables que se encuentran dentro del simplex (Scott, 2007).

El método simplex forma una figura geométrica definida por un número de puntos (en este caso ensayos) dentro de dos ó más ejes (que corresponden a los factores) que al acomodarse en los vértices de esta figura nos dan un punto de mejor respuesta de la variable (R), correspondiente vértice formado por el ensayo en condiciones óptimas

(B), un punto de peor respuesta de la variable, correspondiente al vértice formado por el ensayo de condiciones no óptimas (W) y diversos puntos intermedios (Shavers *et al.*, 1979). Esta figura geométrica se ejemplifica (figura 4) para el caso de dos factores a optimizar (A y B), siendo una figura en dos ejes. Para llegar a la combinación de estos factores que produzca un punto en el vértice de optimización (B) se pueden utilizar tres estrategias:

- 1). Ecuación de reflexión (ecuación 1a). Se utiliza cuando la variable respuesta (R) arroja un valor más alto que la que se tenía en el último vértice conocido de optimización (B). En resumen cuando $R > B$ (Shavers *et al.*, 1979).
- 2). Ecuaciones de contracción p y r (ecuaciones 1b y 1c). Cuando la variable respuesta (R) arroja un valor mas bajo que el vértice de optimización (B) se ha dado un paso en la dirección equivocada y para recolocar la dirección adecuada la figura geométrica debe de ser contraída. Esto se puede lograr de dos maneras: la primera es la contracción r y se utiliza cuando el valor de la variable respuesta (R) es peor que le vértice (B) pero no peor que el vértice (W), $R < B > W$; la segunda es la contracción p y se utiliza cuando la respuesta (R) presenta un valor menor que el vértice (W), $R < B < W$ (Shavers *et al.*, 1979).
- 3). Ecuación de expansión (ecuación 1d). Si la respuesta (R) que se busca es mucho mas grande que el valor del vértice (B) entonces se utiliza la ecuación de expansión. Esta permite llegar al punto de optimización en el menor número de ensayos posibles, sin embargo esta estrategia también podría conducir a puntos muy por fuera de la zona de optimización entre mas alto sea el error estándar de la variable respuesta (Shavers *et al.*, 1979).

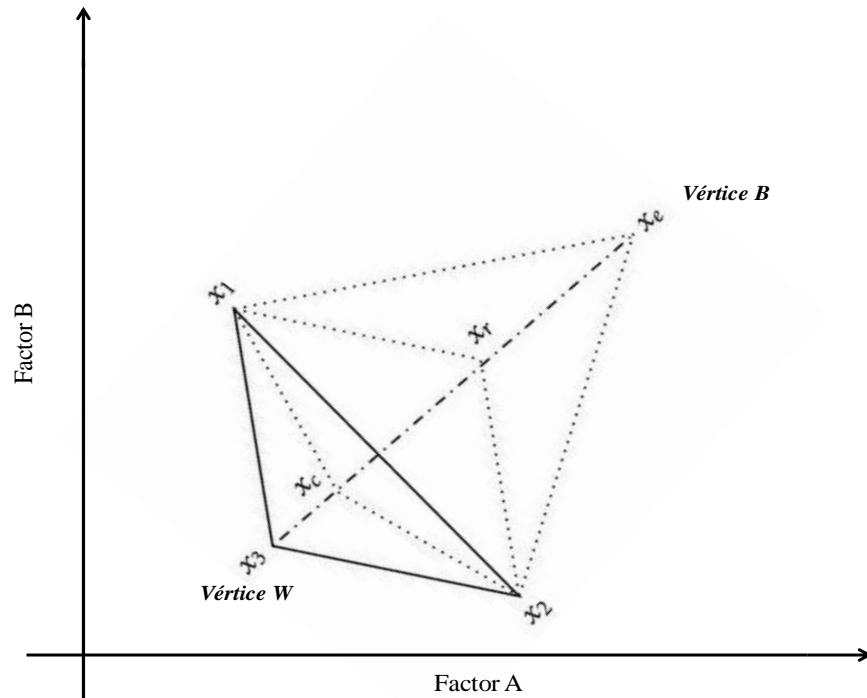


Figura 4 Representación geométrica de un diseño de optimización Simplex con dos factores. x_1 , x_2 y x_3 representan los experimentos iniciales. x_r el experimento teórico obtenido por la ecuación de reflexión, x_c el experimento teórico obtenido por la ecuación de contracción y x_e el experimento obtenido por la ecuación de expansión. Los vértices B y W representan la zona de condiciones óptimas y no óptimas respectivamente.

$$4.1a: R = \bar{P} + (\bar{P} - W)$$

$$4.1b: C_r = \bar{P} + 0.5(\bar{P} - W)$$

$$4.1c: C_p = \bar{P} - 0.5(\bar{P} - W)$$

$$4.1d: E = \bar{P} + 2(\bar{P} - W)$$

Ecuación 1. a: ecuación de reflexión, **b:** ecuación de contracción r, **c:** ecuación de contracción p, **d:** ecuación de expansión.

P: promedio de los valores del factor en los ensayos quitando el peor.
W: valor del factor en el peor ensayo.

Resumiendo esto para un bioproceso de producción de proteínas heterólogas con *P. pastoris* la variable respuesta generalmente se define como la producción de la

proteína heteróloga y los factores a optimizar pueden ser aquellos descritos anteriormente, temperatura, pH, concentración de metanol, biomasa al inicio de la inducción, composición química del medio de cultivo y los vértices de la figura del simplex corresponden a todos los ensayos en el biorreactor con la combinación de estos factores.

En el caso de la optimización de sistemas biológicos por el método Simplex la información es poca. Nuestro grupo de trabajo ya ha utilizado previamente esta metodología para incrementar la producción de hormona de crecimiento recombinante en *P. pastoris* a nivel matraz agitado (Guerrero-Olazarán, 2001; Guerrero-Olazarán, 2002).

4.5. Efecto de la sobre-producción de proteínas sobre el metabolismo de *P. pastoris*

4.5.1 Secreción y plegamiento de la proteína heteróloga

Uno de los pasos cruciales en la secreción de proteínas es el plegamiento de la proteína inmadura y la formación de estructuras secundarias y terciarias, junto con la formación de puentes disulfuro en el retículo endoplasmático (RE). Este paso es clave debido a que un plegamiento adecuado trae como consecuencia proteínas maduras y en su forma activa, por lo tanto este paso determina en un grado alto la productividad del proceso de producción de proteínas en *P. pastoris*. Un componente clave de este sistema es la proteína chaperona BiP, la cual determina el plegamiento correcto de una proteína y su control de calidad a lo largo de todo el proceso dentro del RE se sabe también que esta proteína chaperona está relacionada a procesos de solubilización de péptidos hidrofóbicos, estabilización de subunidades de proteínas oligoméricas y marcaje y re-direccionamiento de proteínas mal plegadas al sistema degradación en proteosoma (la expresión diferencial del gen *kar2* que es responsable de la proteína BiP se toca en el punto 4.7). Cuando este sistema falla debido a factores ambientales y se genera una acumulación de proteínas dentro del RE, se desencadenan procesos que dan a lugar a la secreción y degradación de proteínas mal plegadas tales como la respuesta a proteínas no plegadas en el RE (UPR por sus siglas en ingles) y la degradación de proteínas asociada a retículo endoplásmico (ERAD por sus siglas en ingles (Gasser *et al.*, 2008). Se ha reportado que estos mecanismos de respuesta al estrés por acumulación de proteínas en

el RE se desencadenan por la sobre-expresión de diversas proteínas en distintos sistemas de expresión eucariotes, incluido *P. pastoris* (Gasser *et al.* 2008; Resina *et al.* 2007). Estos dos mecanismos de estrés por acumulación de proteínas se describen a continuación.

El proceso UPR es un proceso de retroalimentación único, debido a su sistema de transducción a través del RE a núcleo de la célula. Cuando se comienzan a acumular péptidos en el RE debido al mal funcionamiento de chaperonas como BiP, la proteína sensor Ire1 se auto-fosforila lo que activa el corte del mRNA del factor de transcripción del proceso UPR (gen *Hac1*) para posteriormente expresar la proteína HAC1 (figura 5) . Este factor de transcripción es responsable de la regulación de cerca de 330 genes, la mayoría relacionados a la biogénesis de organelos secretores, transporte vesicular y formación de lípidos de membrana, haciendo más eficiente la secreción de péptidos (Travers *et al.*, 2000), sin embargo aumenta la cantidad de proteínas no maduras en el espacio extracelular y además, la respuesta UPR también aumenta el funcionamiento del mecanismo de degradación de proteínas ERAD para desahogar el espacio del RE (Figura 6).

ERAD es un complejo proceso en el cual las proteínas mal plegadas son dirigidas al citoplasma, donde son marcadas mediante la enzima ubiquitina y sujetas a degradación por proteosoma (Gasser *et al.*, 2008; Travers *et al.*, 2000), el cual es complejo multi-proteico que lleva a cabo la degradación proteolítica total de proteínas en el citoplasma hasta aminoácidos para su posterior reciclaje (Gasser *et al.*, 2008). Este mecanismo funciona en condiciones normales, sin embargo, se ha demostrado que cuando una célula sobre-expresa proteínas este sistema de degradación puede aumentar su velocidad y degradar mayor cantidad de proteínas debido a la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (Travers *et al.*, 2000).

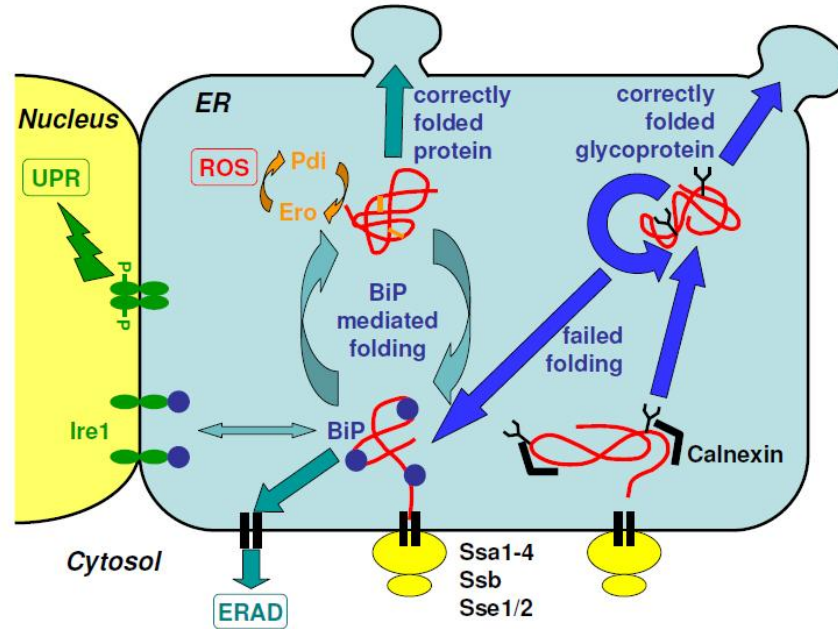


Figura 5. Representación del papel de la chaperona BiP y su relación con el gen Ire1 y Hac1 de la respuesta UPR y con la ERAD (Gasser *et al.*, 2008).

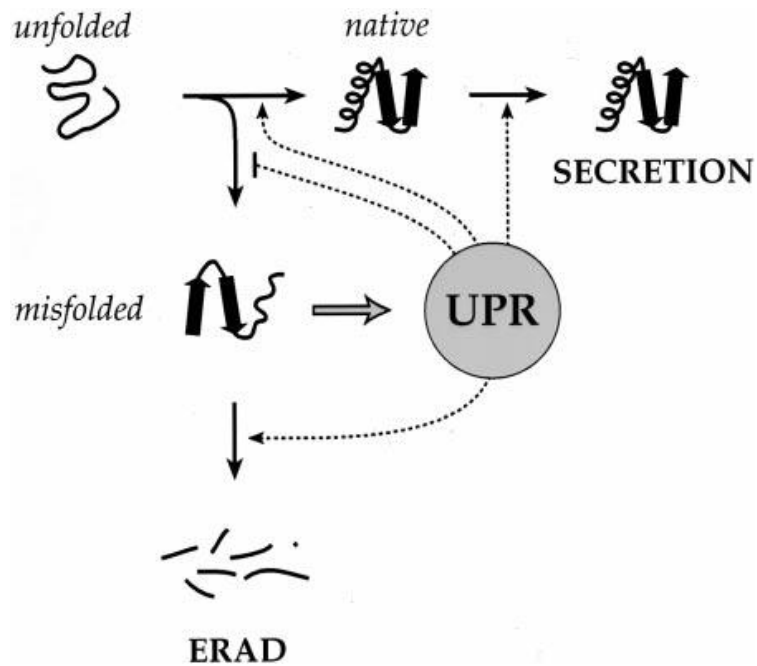


Figura 6. Modelo esquemático que ilustra la acción coordinada de UPR y ERAD. Unfolded: proteína inmadura. Native: proteína madura. Misfolded: proteína mal plegada (Travers *et al.*, 2000).

4.5.2 Remoción del péptido señal para la secreción de la proteína heteróloga

La mayoría de los sistemas de expresión para la secreción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* están bajo el control del pre-pro péptido del factor α de *S. cerevisiae*, cuya secuencia se traduce en el extremo amino-terminal de la proteína de interés y que permite la secreción de la proteína al espacio extracelular, previa remoción de este péptido señal. (Sreekrishna 2010). Este proceso de remoción se lleva a cabo en tres pasos, el primero es la remoción de la porción “pre” por la enzima señal peptidasa en el RE, después las proteasas KEX2 y YPS cortan la porción “pro” y al final una región de repeticiones Glu-Ala es removida por la dipeptidil-aminopeptidasa. Se ha observado que la disrupción parcial o total de los genes que codifican para KEX2 y YPS (*Kex2* y *Yps1*) reducen la degradación proteolítica de proteínas tales como la gelatina de mamíferos (Werten & de Wolf, 2005) y albumina sérica humana recombinantes en *P. pastoris* (Wu *et al.*, 2013). Sin embargo en uno de estos trabajos se señala que esto puede llevar a la producción de una fracción mayoritaria de proteínas muy largas y que contienen el péptido señal aun en el espacio extracelular (Werten & de Wolf, 2005).

4.5.3. Producción y secreción de proteasas al medio de cultivo

Como se mencionó con anterioridad, *P. pastoris* es un sistema de expresión adecuado para producir una alta cantidad de proteínas heterólogas debido a su capacidad de crecer a altas densidades celulares (Cereginho *et al.*, 2002). Sin embargo, en cultivos de altas densidades celulares, la producción de proteasas debido al estrés y a lisis celular es un problema común (Sinha *et al.*, 2005; Bayraktar, 2000). Las vacuolas celulares contienen varias proteasas cuya cantidad varía de acuerdo a las condiciones del cultivo. En *P. Pastoris* las proteasas vacuolares no han sido del todo bien caracterizadas, sin embargo se ha reportado ampliamente la presencia de actividad proteolítica en el espacio extracelular (Jahic *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2011) así como en diversos compartimentos intracelulares (Sinha *et al.*, 2005) incluso identificando por su actividad algunas de las más importantes (Sinha *et al.*, 2005) tales como la proteinasa B, la proteinasa A y la carboxipeptidasa Y. Estas proteasas han sido mejor caracterizadas

para *S. cerevisiae* y a continuación se describe su papel en las vacuolas celulares (Zhang *et al.*, 2007).

La proteinasa A es una aspartil-proteasa codificada por el gen *PEP4* con dominios y actividad similar a otras aspartil-proteasas tales como la pepsina, renina y catepsina D por lo cual recibe también el nombre de “Saccharopepsina”. Se cree que esta proteasa juega un papel clave en la maduración de distintas proteínas en el espacio vacuolar (Zhang *et al.*, 2007, Bayraktar, 2009). Es la proteasa vacuolar más importante además, porque activa a la proteinasa B y carboxipeptidasa Y iniciando así una cascada de activación similar a la que ocurre en el sistema digestivo de eucariotes superiores

La proteina B es codificada por el gen *PRB1* y es miembro de la familia de las serín-proteasas por lo cual presenta una actividad muy similar a la de la tripsina. Se cree que detener la expresión del gen *PRB1* y *PEP4* puede mejorar la producción deteniendo la actividad proteolítica en las vacuolas (Bayraktar, 2009). Un ejemplo de esto son las cepas de *P. pastoris* deficientes en proteasas (SMD1163, SMD1165 y SMD1168), a tales cepas se les eliminó parcialmente el gen *PRB1* así como el gen *PEP4*. Aun así, la ausencia de estos genes redujo la viabilidad de las cepas así que el proceso de producción es más corto, sin embargo combinado con ciertas estrategias puede incrementar la producción de la proteína heteróloga (Sreekrishna, 2010).

La carboxipeptidasa Y es una exo-proteasa de amplio espectro en cuanto a su actividad, por lo cual degrada proteolíticamente muchas proteínas (preferiblemente hidrofóbicas) desde el extremo carboxiterminal (Jung *et al.*, 1999). Es codificada por el gen *PRC1*, borrando este gen, se ha logrado detener la actividad de esta enzima en cepas de *P. pastoris* para aumentar la producción de proteínas de cadenas largas tales como hirudina y endostatina (Sreekrishna, 2010).

4.6 Secuenciación del genoma de *P. pastoris* e importancia en los estudios de expresión de genes en *P. pastoris*

El estudio de la expresión de genes en transcriptomas completos encuentra su origen a mediados de la década pasada. En 2004 se reportó uno de los primeros estudios de transcriptoma completo, utilizando microarreglos en un bioproceso de *P. pastoris*,

utilizando la cepa X-33 de fenotipo Mut^s. Se encontraron, sin embargo, pocas diferencias siendo las principales, en genes del ciclo de Krebs y del metabolismo energético, además que este experimento se realizó con un microarreglo diseñado para *S. cerevisiae* en condiciones estándar de cultivo en biorreactor de *P. pastoris* (Sauer *et al.*, 2004). En 2008 se obtuvo el primer estudio utilizando marcadores específicos para genes en *P. pastoris*, por un método rápido de análisis transcripcional (TRAC) en el cual se estudiaron cerca de 50 genes involucrados en el proceso de secreción de proteínas heterólogas, el autor señala que se encontraron discrepancias conforme a lo estudiado previamente en *S. cerevisiae* recalcando la importancia de utilizar marcadores específicos para *P. pastoris* (Gasser *et al.*, 2007).

En el año 2009, se obtuvo la primera secuenciación de genoma completo de una cepa de *P. pastoris* (GS115), estudio que arrojó una gran cantidad de información. 5,013 genes que codifican para proteínas, de los cuales 3,997 tuvieron al menos un homólogo en la base de datos de secuencias aminoacídicas del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI) lo cual es casi el 80% del espacio del genoma completo. Se incluyó además, información importante acerca de rutas metabólicas y sus intermediarios, siendo las más importantes la ruta de secreción de proteínas con más de 100 genes involucrados y la ruta de metabolismo de metanol con 10 genes. Más información acerca de estas dos importantes rutas se incluye después en la sección 4.8.

Este descubrimiento trajo consigo una oportunidad de realizar estudios de expresión de genes ya no solo de transcriptoma completo, sino también de genes estudiados puntualmente por técnicas más cuantitativas, principalmente qPCR (PCR en tiempo real o PCR cuantitativa) gracias a que las secuencias de todos los genes que sirven para el diseño de ensayos están disponibles desde 2009 en el GenBank NCBI.

4.7 Técnica de RT-qPCR como herramienta para el análisis de la expresión génica

La transcripción reversa (RT) seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) representa la tecnología más poderosa para la amplificación y detección de moléculas de RNA mensajero. Para cuantificar los niveles de expresión de genes en cualquier sistema biológico, el método de RT acoplado al PCR cuantitativo en

tiempo real (RT-qPCR) es el método de elección, ya que presenta ventajas en comparación al ensayo convencional de PCR punto final debido a que la tecnología de detección permite tener alta sensibilidad, alta especificidad, buena reproducibilidad y un amplio rango dinámico de cuantificación. El método RT-qPCR es el más sensible y confiable, en particular para detectar y cuantificar transcritos de poca abundancia en tejidos con bajas concentraciones de RNA, parcialmente degradado y proveniente de fuentes limitadas de tejido (Pfaffl, 2004).

La técnica de qPCR se fundamenta en el uso de un termociclador acoplado a un fluorómetro que permite la determinación del número de copias de DNA que se sintetizan en la reacción para un DNA blanco específico. Mediante una correlación entre el número de copias sintetizadas y el número de ciclos de síntesis, es posible calcular la cantidad o concentración de DNA blanco con el que se inició la reacción. Si el DNA blanco a cuantificar proviene de una reacción de retro-transcripción, esta técnica permite la cuantificación de un transcrito específico y se le denomina retrotranscripción acoplada a PCR de tiempo real o RT-qPCR. De acuerdo con la guía MIQE: Mínima Información para la Publicación de Experimentos de PCR Cuantitativo en tiempo real, se propone que la abreviación qPCR sea utilizada para referirse al PCR cuantitativo en tiempo real, mientras que RT-qPCR se refiera a transcripción reversa-qPCR (Bustin, 2002).

Mientras que la PCR punto final requiere que los productos de PCR sean detectados y cuantificados en geles de electroforesis después de la reacción, la tecnología de qPCR permite la cuantificación de los amplicones durante cada ciclo de PCR, permitiendo una medición cuantitativa de los productos de PCR acumulados durante cada ciclo de la reacción. Las reacciones en tiempo real se llevan a cabo en un termociclador que permite la medición mediante la detección de una molécula fluorescente, lo cual disminuye los pasos de procesamiento posteriores y minimiza el error experimental. Esto se logra principalmente mediante el uso de tecnologías basadas en fluorescencia como: 1) sondas que fluorescen después de la hidrólisis (TaqMan) o hibridación (Tecnología LightCycler); 2) horquillas fluorescentes; ó 3) agentes intercalantes (SYBR Green) (Tabla III). Estos enfoques requieren menos cantidad de RNA y procesan un mayor rango dinámico que la densitometría, y son más resistentes a amplificaciones no específicas (VanGuilder *et al.*, 2008).

El método con sondas de hidrólisis (TaqMan®) emplea sondas específicas contra una secuencia blanco unidas covalentemente a un fluoróforo por el extremo 5' y a un compuesto que absorbe la fluorescencia (“quencher”) por el extremo 3'. Éste último método es mucho más específico para la determinación de la cantidad de copias de DNA generadas por PCR. Las sondas se unen a la secuencia blanco durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR en un sitio interno cercano al sitio de unión de uno de los iniciadores. Posteriormente, durante la etapa de polimerización-extensión, la Taq DNA polimerasa degrada la sonda mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual hace que el fluoróforo y el quencher se separen y se genere fluorescencia que se mide con el fluorómetro. El empleo de sondas de hidrólisis en el qPCR hace que éste sea un método cuantitativo muy específico para un DNA blanco determinado, y junto con la multiplicidad de canales de fluorescencia que tienen los nuevos termocicladores (hasta seis longitudes de onda por tubo de reacción) ha hecho que este método de cuantificación sea el más usado para la qPCR. Esta técnica presenta la desventaja del costo del diseño y síntesis de sondas específicas para la cantidad de genes que abarca la expresión de un genoma completo. SYBR Green es un ejemplo de un agente intercalante que fluoresce con la unión a DNA de doble cadena. Después de la síntesis mediada por oligonucleótidos específicos de la secuencia blanco durante el ensayo de PCR, múltiples moléculas de SYBR Green se unen al producto y emiten una fuerte señal de fluorescencia, la cual es fácilmente detectada. Debido a que SYBR Green se une indiscriminadamente a DNA de doble cadena, las secuencias de dímeros de oligonucleótidos y errores de amplificación (productos inespecíficos) son detectados en la fluorescencia. Una consecuencia de la unión de múltiples moléculas, es que la cantidad de señal es dependiente de la masa molecular del producto de DNA de doble cadena creado en la reacción. Si las eficiencias de amplificación son las mismas, la amplificación de un producto más grande, generará una mayor señal que un producto más corto. Los agentes intercalantes (comúnmente el SYBR Green) se añaden a la mezcla de PCR y se intercalan entre las dos hebras del DNA a lo largo de los ciclos de amplificación, induciendo fluorescencia que posteriormente se mide para cuantificar la cantidad de DNA inicial. Debido a la baja especificidad de estos agentes intercalantes, es recomendable realizar una determinación de la curva de disociación del producto

amplificado para comprobar su identidad y la ausencia de productos inespecíficos (VanGuilder *et al.*, 2008).

4.7.1 Análisis de datos y diseño experimental de los ensayos de RT-qPCR

Para la cuantificación de los valores obtenidos en los ensayos de RT-qPCR existen dos tipos generales de estrategias: los niveles de genes expresados pueden medirse de manera absoluta o relativa. La cuantificación absoluta relaciona la señal de fluorescencia del qPCR con el número de copias empleando una curva de calibración, las cuales pueden derivar de productos de PCR diluidos, DNAc o DNA recombinante, plásmidos linealizados, o muestras de tejido. Este enfoque absoluto es erróneo, ya que la cuantificación se muestra relativa al uso de una curva de calibración. El número de copias de RNAm debe ser correlacionado a algunos parámetros biológicos, como la masa de la muestra, la cantidad total de RNA, un número definido de células, o compararlo con el número de copias de un gen de referencia como podría ser RNA ribosomal ó genes constitutivos (Pfaffl, 2004). La cuantificación relativa o comparativa, mide el cambio relativo en los niveles de expresión de RNAm, determina el cambio en los niveles de RNAm de un gen en un estado a través de múltiples muestras y lo expresa relativo a los niveles de otro RNAm. La cuantificación relativa no requiere una curva de calibración o estándares con concentraciones conocidas y la referencia puede ser cualquier transcrito, siempre y cuando se conozca su secuencia para el buen diseño de oligonucleótidos y sondas correspondientes (Bustin, 2002).

Tabla III

Tecnologías de detección, disponibles para RT-qPCR.

Tecnología	Fabricante	Detección	Ensayos múltiples	Análisis de curva de disociación
TaqMan	Applied Biosystems	Sondas de hidrólisis	Si	NN
PrimeTime	IDT Technologies	Sondas de hidrólisis	Si	NN
LightCycler	Roche	Sondas de hibridación	Si	NN
LUX	Invitrogen	Sonda de horquilla, hibridación	Si	N
Oligobalizas (Molecular Beacons)	Sigma-Aldrich, ITD	Horquilla bucle, hibridación	Sí	N
SYBR Green	Multiple	Agente intercalante	No	N

NN: No es necesario

N: Necesario

Para determinar los niveles relativos de expresión, se miden las diferencias (Δ) entre el número de ciclos de amplificación del gen de interés y un gen normalizador en donde la señal de fluorescencia de cada uno cruza un umbral de fluorescencia determinado (C_T), y posteriormente se compara el nivel relativo de expresión del gen de interés con una muestra calibradora: control sin tratamiento, el tiempo cero, individuos sanos, etc. Este método se denomina método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2004), y se basa en dos suposiciones: la primera es que todas las reacciones ocurren con 100% de eficiencia, es decir, que en cada ciclo de PCR la cantidad de producto se duplica. La segunda suposición es que hay un gen (o genes) que se expresa en un nivel constante en todas las muestras. Este control endógeno se emplea para corregir cualquier diferencia en el

muestreo. Una vez que se obtienen los datos de C_T de cada reacción, se pueden generar niveles relativos de expresión (VanGuilder *et al.*, 2008).

Para obtener resultados con una expresión relativa confiable, se deben generar estrategias de normalización para el control del error experimental y para asegurar un rendimiento idéntico durante el ensayo de RT-qPCR. Todas las comparaciones relativas deben realizarse con una cantidad constante de RNA o masa de tejido de muestra analizada, o una cantidad idéntica de células seleccionadas. Para asegurar que las condiciones iniciales del ensayo sean idénticas, la expresión relativa de los datos debe ser equilibrada o normalizada de acuerdo al tamaño o masa de las muestras o el volumen de tejido, la cantidad total de RNA obtenida, la cantidad de DNA genómico obtenida, RNAs ribosomales de referencia (18S o 26S rRNA), RNAs mensajeros de referencia, cantidad total de DNA genómico, moléculas de DNA o RNA artificial (Pfaffl, 2004). Para la normalización se emplea el uso de genes de expresión constitutiva (housekeeping) o de linaje específico, los cuales también se denominan genes de referencia. La selección de estos genes debe cumplir los siguientes requisitos: expresión similar entre todas las muestras en un estudio dado, expresión resistente a las condiciones experimentales, y expresión que se somete a todos los pasos del ensayo de qPCR con la misma cinética que los genes blanco. Generalmente, la transcripción de estos genes es resistente a las condiciones experimentales, haciéndolos adecuados como controles endógenos para una normalización (Vanguilder *et al.*, 2008). Se ha concluido que para obtener una medición más acertada y confiable de los niveles de expresión relativos, se debe realizar una normalización empleando múltiples genes de referencia en vez de uno, para lo cual se deben realizar cálculos para determinar los genes de referencia con los que se obtienen los mejores resultados. Además, se debe emplear la media geométrica de los valores de expresión relativa de los genes normalizadores, en vez de la media aritmética, ya que la primera controla mejor los posibles valores aislados y de diferencia de abundancia entre diferentes genes. Por último se recomienda el uso mínimo de tres genes de referencia con la expresión relativa más estable para los cálculos de RT-qPCR (Vandermompele *et al.*, 2002).

La técnica de qPCR ha demostrado ser de utilidad en *P. pastoris* para medir niveles de expresión de genes con distintas finalidades, tales como determinar el

aumento de expresión de genes heterólogos y la eficiencia de su promotor (Love *et al.*, 2012) ó medir la expresión de diversos genes de una ruta metabólica (Krainer *et al.*, 2012). También resulta útil para determinar el número de copias de un gen heterólogo, también llamado “gene dosage” (Norden *et al.*, 2011).

4.8 Estudio de la expresión de genes en rutas metabólicas de *P. pastoris*

En el presente trabajo, es de interés estudiar componentes de dos rutas metabólicas, específicamente la ruta de plegamiento y secreción de proteínas, así como, la ruta catabólica del metabolismo de metanol. Ambas se explican a continuación.

4.8.1 Plegamiento y secreción de proteínas

La ruta metabólica de secreción de proteínas en *P. pastoris* se muestra en la figura 7b y corresponde a una ruta típica de secreción por exocitosis. Inicia en el mismo momento que se traduce y transloca el péptido inmaduro en la membrana del retículo endoplasmático (RE) por acción del complejo multimérico SEC61-OST (Genes *SEC61*, *SBH1*, *SSS1*, *STT3*, *SWP1*, *WBP1* y *OST1-6*) que además marca la proteína con un O-oligosacárido. Posteriormente la proteína entra a la matriz del RE donde el péptido “pre” es cortado por el complejo enzimático señal peptidasa (genes *SPC1*, 2, 3 y *SEC11*) y entonces, diversas proteínas de control de calidad y chaperonas comienzan a interactuar con la proteína a través de su paso por el RE (genes *KAR2*, *ROT1*, *LHS1*, *CNE1*, *YDJ1*, *EPS1*, *SHR3*, *SIL1*, *HTM1* y *UGGT*) donde además son glicosiladas en sus sitios correspondientes tanto a N y O-glicosilaciones. Posteriormente la proteína correctamente plegada es translocada al complejo Golgi donde los oligosacáridos enlazados sufren reducciones y adiciones de mas monosacáridos a la cadena (comúnmente Manosas), a su vez la proteína sufre el corte del péptido “pre” por acción de la proteasa KEX2 (gen *KEX2*) y es empacada en una vacuola secretora para ser madurada (en algunos casos) por diversas exo y endo-proteasas (*PEP4*, *PRB1*, *PRC1*, *YPS1*, 2, 3 y 7, *MKC7*, *ATG4*, *GPI8*, *HSP31,32* y 33 y *SNO4*), por último, la vacuola libera su contenido al espacio extracelular mediante exocitosis (De Schutter *et al.*, 2009).

4.8.2 Metabolismo de metanol

En cultivos inducidos con metanol en *P. pastoris*, el metanol generalmente sirve como única fuente de carbono y energía, esto hace de la vía metabólica de metanol una ruta de un tronco común con dos “ramas” las cuales se muestran en la figura 7a. El tronco común inicia cuando el metanol es ingresado al peroxisoma e inmediatamente es reducido para formar formaldehído y peróxido de hidrógeno por la enzima AOX (gen *AOX*). A partir de este punto, la ruta se divide en una parte anabólica y otra catabólica para la generación de energía. Dos moléculas de formaldehído pueden ser usadas para generar di-hidroxi-acetona mediante la enzima di-hidroxi-acetona sintasa (gen *DAS*), estas moléculas de di-hidroxi-acetona a su vez, sirven para generar cíclicamente Gliceraldehído-3-fosfato mediante diversas enzimas, siendo la más importante la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gen *GAP*) esta rama de la ruta termina en la vía de las pentosas fosfato para la generación de monosacáridos estructurales para la construcción celular. La segunda rama de la vía comienza con el enlace de glutatión al formaldehído para formar formil-glutatión mediante la enzima formaldehído deshidrogenasa (gen *FLD*) en este paso se genera una molécula de NADH, posteriormente la formil-glutation hidrolasa remueve el glutatión para general formiato que es reducido hasta CO₂ gracias a la enzima formiato deshidrogenasa (gen *FDH*). Esta formación de CO₂ libera una molécula de NADH por lo cual al final del catabolismo del metanol se generan dos moléculas de NADH en total que generan directamente energía en forma de ATP en la cadena respiratoria (De Schutter *et al.* 2009).

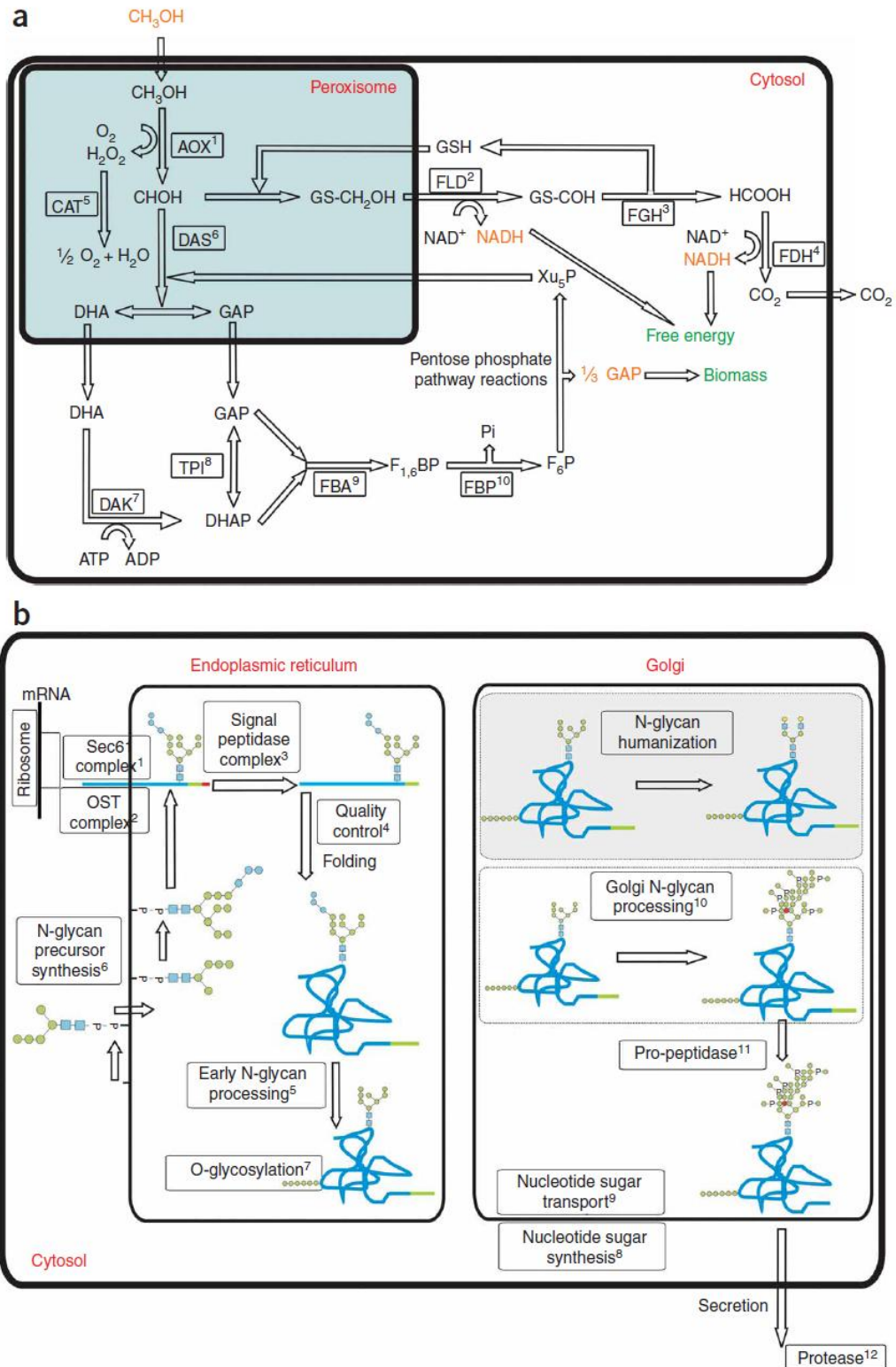


Figura 7. Esquemas resumidos de **a:** Ruta de metabolismo de metanol y **b:** Ruta de secreción de proteínas en *P. pastoris* (De Schutter *et al.*, 2009).

5 METODOS

5.1 Material biológico y equipos

El proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Molecular L5 y la planta piloto de Fermentación del Instituto de Biotecnología del la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

Se trabajó con la cepa KM71FTEII de *P. pastoris* construida previamente en nuestro laboratorio (Viader-Salvadó, et al. 2010). Esta cepa tiene el fenotipo Mut^s que contienen en su genoma una secuencia nucleotídica que codifica para la fitasa con estructura de hélice denominada FTEII fusionada a la secuencia pre-pro del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y produce y secreta la fitasa FTEII.

Para el desarrollo de los cultivos en biorreactor se utilizó: Un bioreactor Bioflo III (*New Brunswick Scientific Co. Inc*), sistema de enfriamiento externo (*Polysciense*), compresora de aire, autoclave vertical (*AMSCO*), electrodo de pH Ingold (*Mettler, Toledo*), electrodo de O₂ Oxyprobe 12 mm (*Broadley Technologies*), dos filtros de aire de 0.2 μ (*Gelman Acro*), bomba peristáltica (*Biorad Econo pump*). Para el sistema de adquisición de datos en línea con el biorreactor se utilizó el programa computacional Biostat Foxy logic version 4.1, para el control de metanol se utilizó el sensor MC-168 (*PTI instruments Inc*) y su software NB208 Windows así como un sistema relevador de corriente eléctrica. Para los cultivos en matraz agitado se utilizaron: Matraces Erlenmayer de 250, 500 y 6000 mL (*Corning-Pyrex*), incubadora ambiental con control de temperatura y agitación (*Lab-line*), campana de bioseguridad II (*Labconco*), espectrofotómetro Smartspect 3000 (*Biorad*). Para los análisis de proteínas, actividad enzimática y actividad de proteasas se utilizó: Un agitador magnético (*PC103 Corning*), bomba de vacío (*0322-V4B-G180X General Electric*), espectrofotómetro UV/VIS DU 650 (*Beckman Coulter*), cubetas desechables de poliestireno (*Plastibrand*), reactivo azul

brillante de Comassie G-250 (*Sigma Chemical Co*), papel filtro (*Whatman no.1*), micro pipeta de volumen variable 20-200 μL (*WVR brand 40000-204*), micro pipeta de volumen variable 100-1000 μL (*WVR brand 40000-208*), baño de agua termostado (*Precision*), balanza granataría PG-4002 (*Mettler Toledo*), balanza analítica AG285 (*Mettler Toledo*), incubadora 37°C (*Precision*). Para el almacenamiento de cepas e inóculos se utilizó un congelador (-20°C), tubos corning de 15 mL. Para el ensayo de ELISA se utilizaron placas de 96 pocillos Nunc® (*Apogent*), anticuerpo primario anti-FTEII (*Genescript co.*), anticuerpo secundario anti-IgG conejo conjugado con fosfatasa alcalina (*Sigma-Aldrich*) y un equipo de lectura de placas de ELISA (*Biorad 300*). Para las técnicas de determinación de ácidos nucleicos un nanodrop®1000 (*Thermo Scientific*), cámara horizontal de electroforesis, Bioanalyzer 2100 (*Agilent Agilent Technologies, Santa Clara, CA*), termociclador para PCR punto final Multigene Mini (*Labnet*) y termociclador para PCR tiempo real Strategene Mx3005P (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA*). El procesador de datos empleado para elaborar todos los gráficos y tablas así como este escrito, fue una computadora personal HP pavilion dv1000 entertainment notebook Intel Centrino (*Hewlett packard*), el procesador de texto utilizado fue Microsoft Word 2007 (*Microsoft Corp. 1987-2007*), el procesador de gráficos y tablas Microsoft Excel 2007 (*Microsoft Corp. 1987-2007*), el editor de gráficos Adobe photoshop 7.0 (*1990-2002 Adobe system inc.*) y el paquete computacional Microsoft Power point 2007 (*Microsoft Corp. 1987-2007*).

Para los cultivos en biorreactor se emplearon el medio mínimo amortiguado y adicionado con glicerol y extracto de levadura (BMGY), y el medio de fermentación de sales basales (FBS), los cuales se prepararon tal como se ha descrito previamente (*Stratton et al., 1998; Invitrogen, 2002*). Las sales traza PTM1 se adquirieron en Invitrogen (*San Diego, CA*). Para la conservación del RNA celular se utilizó el reactivo RNAlater (*Ambion, Grand Island, NY*). Para las preparaciones de RNA, se utilizó el kit SV Total RNA Isolation System (*Promega, Madison, WI*). Para el tratamiento con DNasa se utilizó el kit de DNasa RQ1 libre de RNasa (*Madison, WI*). Para la síntesis del DNAc se utilizó el kit AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA*) para 50 reacciones. Para los ensayos de qPCR se utilizaron Master Mix Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR & QRT-PCR

(Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y Brilliant III Ultra-Fast QPCR & QRT-PCR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), oligonucleótidos 5qKEX2, 3qKEX2, 5qAOX2, 3qAOX2, 5qPEP4, 3qPEP4, 5qPRC1, 3qPRC1, 5qPRB1, 3qPRB1, 5qYPT1, 3qYPT1, 5qKAR2, 3qKAR2, 5qG6PD, 3qG6PD, 5qGAP, 3qGAP, 5qFTEII y 3qFTEII (3.0 μ M cada uno) (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa) y los kit PrimeTime Mini (5qFTEII 1.0 nM, 3qFTEII 1.0 nM y sonda de hidrólisis qFTEII 0.5 nM, y 5qGAP 1.0 nM, 3qGAP 1.0 nM y sonda de hidrólisis qGAP 0.5 nM) (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa). Otros reactivos fueron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) o de Productos Químicos Monterrey (Monterrey, N.L., México).

5.2 Estrategia general

Para llevar a cabo el análisis de la respuesta metabólica de *P. pastoris* KM71FTEII involucrada con el incremento de la producción de la fitasa FTEII se plantearon 2 etapas experimentales: La primera etapa consistió en el desarrollo de un proceso de optimización de condiciones de cultivo conformada a su vez por tres fases: en la primera fase, se desarrolló un método para definir las variables de las condiciones de cultivo que se emplearon para conformar el diseño experimental para la optimización, en la segunda fase se realizó un diseño del proceso de optimización empleando el método multifactorial Simplex Secuencial considerando los parámetros de las condiciones de cultivo definidos en la primera fase y en la tercera fase se llevó a cabo el proceso de optimización tomando la producción volumétrica de la proteína heteróloga (FTEII) como parámetro respuesta y evaluando parámetros representativos de la respuesta metabólica. La optimización se realizó considerando cinco factores ambientales (concentración de metanol en el medio de cultivo, temperatura, pH, adición de una fuente extra de carbono, y densidad celular al inicio de la etapa de inducción) que definen las condiciones de cultivo en la etapa de inducción del gen heterólogo para incrementar la producción extracelular de la fitasa FTEII en cultivos en biorreactor.

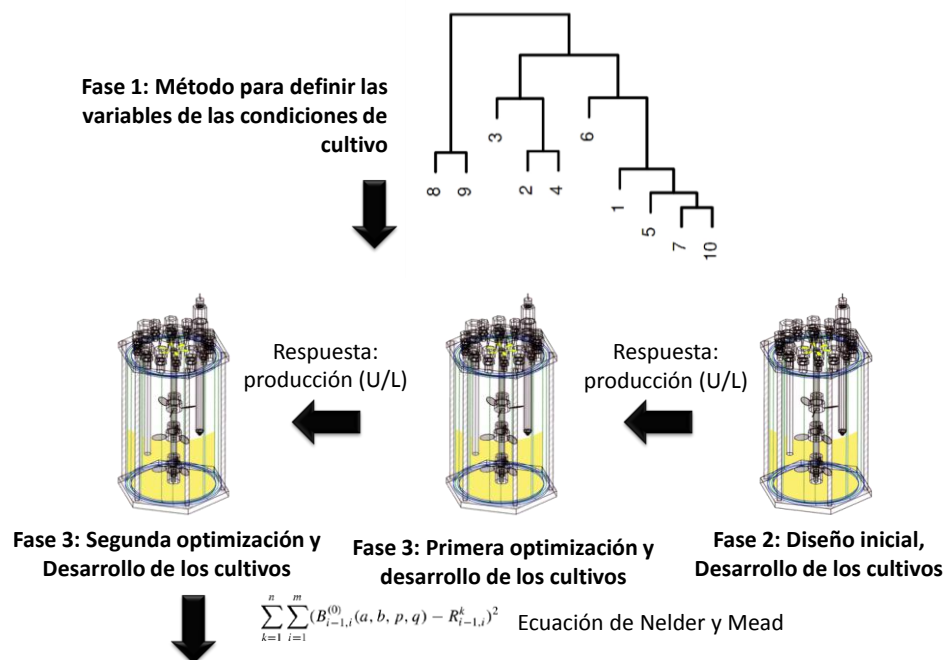
El proceso de optimización se llevó a cabo mediante diez cultivos en biorreactor, con los cuales se correlacionó la producción volumétrica extracelular de fitasa durante la etapa de inducción con la respuesta fisiológica del hospedero, evaluada mediante el

consumo de metanol, la velocidad específica de crecimiento (μ), el rendimiento celular proveniente de metanol ($Y_{x/s}$), el rendimiento de la producción extracelular de fitasa/biomasa ($Y_{p/x}$), el rendimiento de la producción extracelular de fitasa proveniente de metanol ($Y_{p/s}$), la actividad de proteasas en el medio de cultivo libre de células, el porcentaje de secreción de fitasa al medio de cultivo, y la velocidad específica de consumo de metanol (q_s).

La segunda etapa experimental consistió en el análisis y comparación de la respuesta metabólica del cultivo más productivo con el cultivo menos productivo, esto con el objetivo de determinar los factores que afectan la productividad de un cultivo. La respuesta metabólica en esta etapa fue evaluada mediante los parámetros antes mencionados y con la evaluación de la expresión diferencial de genes involucrados en la vía de secreción de proteínas, producción de proteasas y el metabolismo de metanol por RTqPCR.

La estrategia general se resume en la figura 8.

ETAPA 1



ETAPA 2

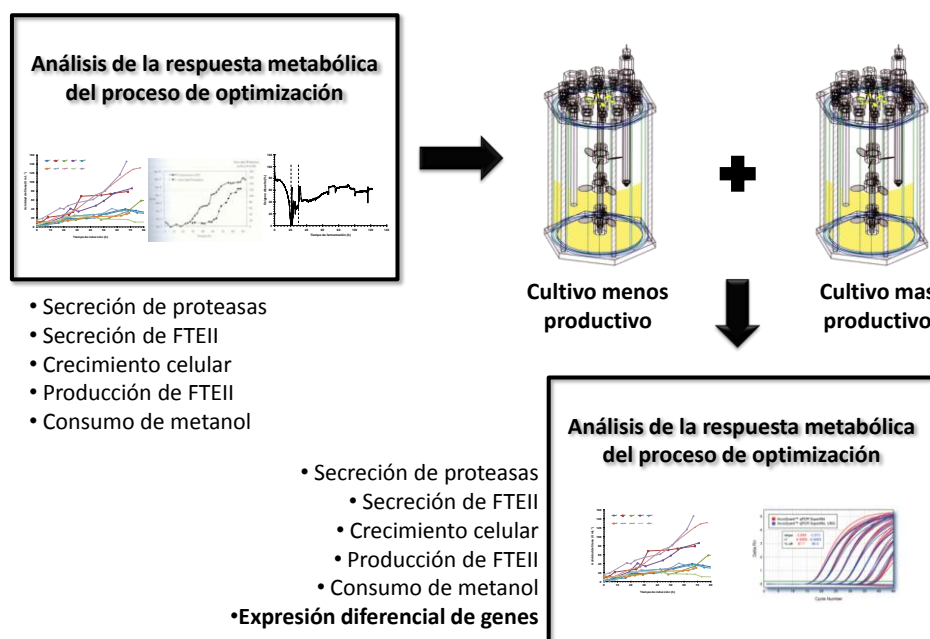


Figura 8. Estrategia experimental general empleada.

5.3 Optimización de factores ambientales que definen las condiciones de cultivo para incrementar la producción una fitasa extracelular en *P. pastoris*. Etapa 1

5.3.1 Definición de la combinación de variables para las condiciones de cultivo

La definición de variables que influyen en la productividad de un proceso en *P. pastoris* se llevó a cabo mediante un estudio teórico a través del análisis de 45 artículos científicos que hacen referencia a la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* a nivel biorreactor. Para todos los casos reportados se estimó el valor de la productividad volumétrica (g/L*h) de proteínas heterólogas usando su producción máxima en g/L y dividiendo ésta entre el tiempo de inducción con metanol (h) en la cual se alcanzó la productividad máxima.

Con la información de las condiciones de cultivo de estos procesos (temperatura (°C), pH, densidad celular (g/L), concentración de metanol (g/L) y presencia de sorbitol) se realizó un análisis de grupos (clusters) definiendo vectores multidimensionales, calculando un índice de similitud a través del producto vectorial entre dos vectores y empleando el método de agrupamiento de pares sin ponderación y con medias aritméticas (UPGMA, “Unweighted Pair Group method with Arithmetic Mean”) o el método de vecinos juntos (“Neighbour Joining”). Se calculó la productividad volumétrica promedio de cada grupo promediando las productividades volumétricas de cada elemento de un grupo específico. Los reportes agrupados en mayor productividad volumétrica promedio se usaron para definir valores altos de las variables a emplear en la optimización mediante el método Simplex, mientras que los trabajos agrupados en el grupo con menor productividad volumétrica se usaron para definir valores bajos de estas variables.

5.3.2. Diseño del proceso de optimización empleando el método multifactorial Simplex Secuencial

Para el proceso de optimización se realizó un diseño de experimentos empleando el método Simplex Secuencial (Shavers et al., 1979), con el fin de definir las condiciones de cultivo en la etapa de inducción del gen heterólogo para incrementar la producción extracelular en *P. pastoris* de la fitasa FTEII en cultivos en biorreactor. Para

el diseño Simplex Secuencial se utilizaron cinco factores ambientales (concentración de metanol en el medio de cultivo, temperatura, pH, adición de una fuente extra de carbono, y densidad celular al inicio de la etapa de inducción), estos se combinaron en 7 cultivos iniciales (Tabla IV), utilizando combinaciones de dos niveles en cada uno de los cinco factores de las condiciones de cultivo:

- Temperatura: 30 y 20°C
- pH: 5 y 6
- Densidad celular: 250 y 350 g/L de peso húmedo
- Metanol: 0.5 y 1 g/L
- Sorbitol: Presencia (1) y ausencia (0)

Como factor de respuesta a maximizar se utilizó como el factor de respuesta la actividad extracelular total de fitasa resultante (A_{etf}).

El proceso de optimación se realizó en cuatro etapas secuenciales realizando un total de diez cultivos, empezando con siete cultivos, en la primera etapa, en los que se establecieron las condiciones de cultivo según un diseño factorial simplificado con dos niveles para cada factor a optimizar (Tabla IV), en las siguientes etapas, las condiciones de cultivo (los tres últimos cultivos) se establecieron al aplicar la ecuación de reflexión del método Simplex Secuencial Básico (Ecuación 2). Después de realizados los primeros siete cultivos (B-H), se ordenaron de menor a mayor por actividad de fitasa extracelular, se utilizó para cada factor en las condiciones de cultivo, la ecuación para simplex secuencial (Ecuación 2), de cada factor de las condiciones de cultivo se obtuvieron valores nuevos para dos cultivos más (I y A) y posteriormente utilizando la ecuación de contracción P (Ecuación 3) se obtuvieron las condiciones para el cultivo J (Tabla V).

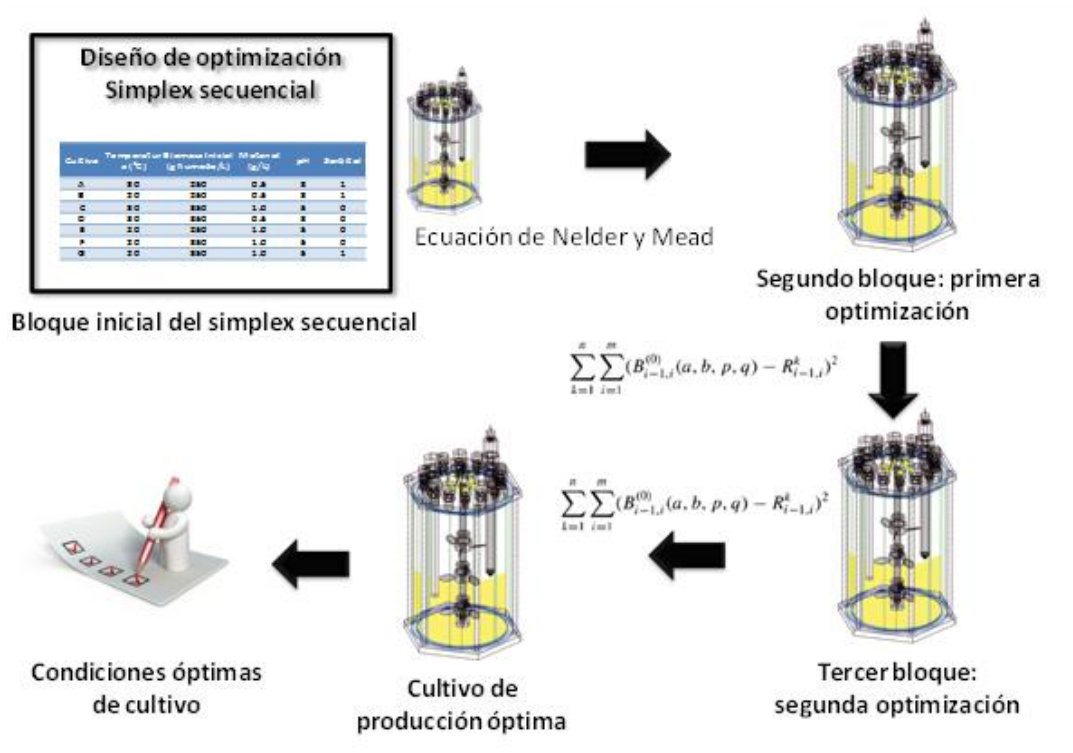


Figura 9. Metodología empleada para la optimización por Simplex secuencial.

Tabla IV

Condiciones iniciales de los siete cultivos iniciales del diseño Simplex.

Cultivo	Temperatura (°C)	Densidad celular (g/L)	Metanol (g/L)	pH	Sorbitol
B	30	350 ^a (87.5) ^b	1.0	5	0
C	30	350 ^a (87.5) ^b	0.5	3	0
D	20	250 ^a (62.5) ^b	0.5	3	1
E	30	250 ^a (62.5) ^b	0.5	3	1
F	20	250 ^a (62.5) ^b	1.0	5	0
G	20	350 ^a (62.5) ^b	1.0	5	0
H	20	350 ^a (62.5) ^b	1.0	5	1

^a Peso húmedo, ^b Peso seco

$$x = [2(\overline{X_{FMC}})] - FPC$$

Ecuación 2. Ecuación Simplex secuencial usada para obtener nuevos valores de cada factor para las nuevas condiciones de cultivo.

- x : Nuevo factor para las condiciones de cultivo
 X_{FMC} : Media de la los valores del factor en los cultivos de mayor actividad de fitasa
 FPC : Valor del factor en el cultivo de menor actividad de fitasa

$$x = X_{FMC} + 0.5(FPC)$$

Ecuación 3. Ecuación de contracción P usada para obtener nuevos valores de cada factor para las nuevas condiciones de cultivo.

- x : Nuevo factor para las condiciones de cultivo
 X_{FMC} : Media de la los valores del factor en los cultivos de mayor actividad de fitasa
 FPC : Valor del factor en el cultivo de menor actividad de fitasa

Tabla V

Tres cultivos finales del simplex con condiciones de cultivo optimizadas.

Cultivo	Temperatura (°C)	Densidad celular (g/L)	Metanol (g/L)	pH	Sorbitol
H	15-18	380 ^a (95) ^b	1.5	6	0
A	25	360 ^a (90) ^b	2.0	7	0
J	24	360 ^a (90) ^b	1.5	6	0

^aPeso húmedo ^bPeso seco

5.3.3 Proceso de optimización empleando el método multifactorial Simplex Secuencial

La optimización se realizó tomando la actividad extracelular total de fitasa resultante (A_{etf}) como parámetro de respuesta. Con los diez cultivos se optimizaron la concentración de metanol en el medio de cultivo (0.5-2.0 g/L), temperatura (15-30°C) y pH (3-7) en la etapa de inducción, adición de una fuente extra de carbono (sorbitol), y la densidad celular al inicio de la etapa de inducción (63-95 g/L de peso seco), mediante el método de optimización Simplex Secuencial para incrementar la producción extracelular de fitasa.

Para cada cultivo, se definió un conjunto de cinco valores, uno para cada factor a optimizar (Tabla IV), y se determinó la actividad extracelular total de fitasa resultante como el factor de respuesta. El proceso de optimización se llevó a cabo en cuatro etapas secuenciales. Los primeros experimentos comprendieron siete cultivos, B a H, (Tabla IV) en los que se combinaron niveles altos y bajos de los cinco factores (paso 1 de la optimización). Después de analizar el factor de respuesta de los experimentos, el método de optimización Simplex propuso un nuevo conjunto de valores para los factores a optimizar. Estos valores se convirtieron en las condiciones de cultivo para el próximo experimento (cultivo I, paso 2 de la optimización). Del mismo modo, se definieron las condiciones de cultivo para el cultivo A, paso 3 de la optimización, y el cultivo J, paso 4 de la optimización (Tabla V).

Finalmente a través del proceso de optimización, realizado mediante diez cultivos en biorreactor (Figura 9), se correlacionó la producción volumétrica extracelular de la fitasa FTEII durante la etapa de inducción con la respuesta fisiológica del hospedero, evaluada mediante el consumo de metanol, la velocidad específica de crecimiento (μ), el rendimiento celular dependiente de metanol ($Y_{x/s}$), el rendimiento de la producción extracelular de fitasa por biomasa ($Y_{p/x}$), el rendimiento de la producción extracelular de fitasa dependiente de metanol ($Y_{p/s}$), la actividad de proteasas en el medio de cultivo libre de células, el porcentaje de secreción de fitasa al medio de cultivo, y la velocidad específica de consumo de metanol (q_s).

5.3.4 Estrategia de cultivos en biorreactor de 5 L

Se realizaron un total de diez cultivos en un biorreactor de 5 L BioFlo III (New Brunswick Scientific Co., Inc.), conectado al programa de control FoxyLogic Fermentor Control Program 4.3 (<http://www.foxylogic.com>).

Para todos los cultivos se utilizó el mismo lote de inóculo el cual se preparó en 2 L de medio BMGY de forma similar a como se ha descrito previamente (Viader-Salvadó *et al.*, 2013). Los diez cultivos se realizaron empleando tres etapas: lote de glicerol, y lotes alimentados con glicerol y metanol. La primera etapa se llevó a cabo a 30°C y pH 5 en 2 L de medio FBS con 50 g/L de glicerol, hasta agotar la fuente de carbono (19-22 h). La segunda etapa se inició después de una ausencia de alimentación de 45 min y se realizó hasta alcanzar la densidad celular deseada para el inicio de la etapa de inducción (9-16 h), alimentando glicerol al 50% (12 mL/L de biotina 0.02% y PTM1). La última etapa se inició después de 45 min de ausencia de alimentación y un ajuste de pH al valor deseado, alimentando con 100% metanol (12 mL/L de 0.02% biotina y PTM1) por al menos 68 h. La concentración de metanol en el medio de cultivo se mantuvo constante a valores comprendidos entre 0.5-2.0 g/L, usando un bucle cerrado de control con ayuda del controlador MC-168 (PTI Instruments, Kathleen, GA), el programa NB208 (PTI Instruments, Kathleen, GA), y una bomba de adición de metanol (Masterflex L/S DIGI-STALTIC Dispensing System, Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL). El valor del oxígeno disuelto se mantuvo por arriba del 20% de saturación con suplementación de mezclas de oxígeno-aire según fue necesario. En los cultivos que se añadió sorbitol se realizó de manera constante a una velocidad de adición de 3.3 g/h.

De todos los cultivos se evaluó el crecimiento celular a partir de la densidad celular de células secas (g/L) correspondientes a 2 mL de medio de cultivo, teniendo en cuenta que 1 g de células húmedas son aproximadamente 0.25 g de células secas. También se estimó la producción extracelular de fitasa a partir de la determinación de la actividad enzimática volumétrica de fitasa (U/L). El volumen consumido de metanol se consideró que correspondía al volumen total de metanol añadido en la etapa de inducción por el controlador de metanol, el cual demandó automáticamente la cantidad de metanol necesaria para mantener la concentración de metanol en el medio de cultivo

en el valor deseado. Con estos parámetros se estimaron evaluada mediante el consumo de metanol, la velocidad específica de crecimiento (μ), el rendimiento celular proveniente de metanol ($Y_{x/s}$), el rendimiento de la producción extracelular de fitasa/biomasa ($Y_{p/x}$), el rendimiento de la producción extracelular de fitasa proveniente de metanol ($Y_{p/s}$), el porcentaje de secreción de fitasa al medio de cultivo, y la velocidad específica de consumo de metanol (q_s), además se determinó la actividad de proteasas en el medio de cultivo libre de células.

La metodología general del bioproceso para todos los cultivos esta esquematizada en la figura 10.

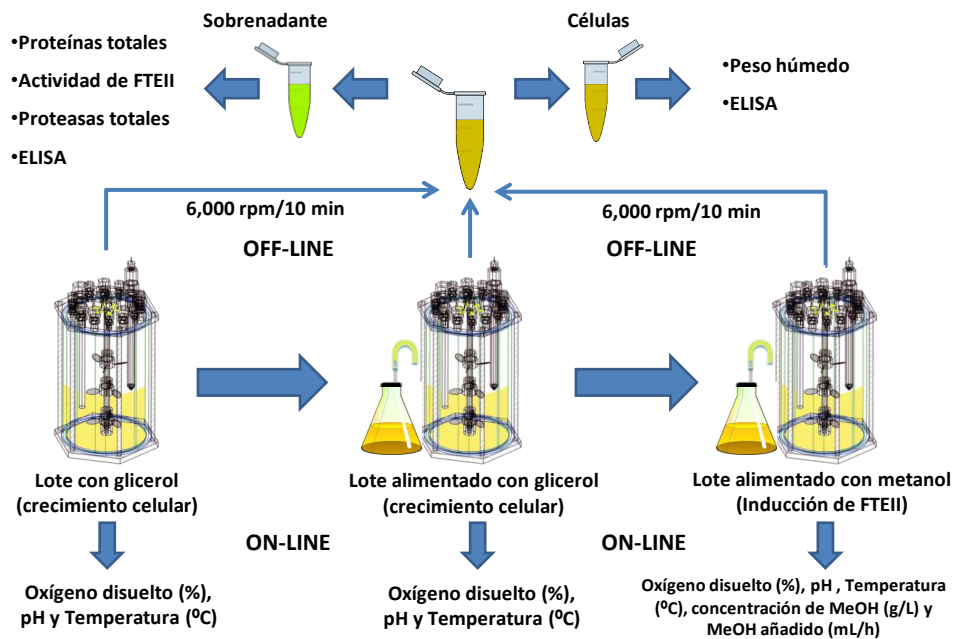


Figura 10. Metodología general de cultivo en biorreactor de 5 L.

5.3.4.1. Preparación y conservación de inóculos para los cultivos en biorreactor

Con el fin de obtener inóculos suficientes para emplearlos en todos los cultivos a nivel biorreactor, se realizó un cultivo en 600 mL de medio BMGY (peptona 2%, extracto de levadura 1%, YNB 1.34%, buffer de fosfatos 100 mM pH 6, biotina 0.02%,

glicerol 10%) en matraz agitado de 6 L. La metodología se representa de manera gráfica en la figura 11 y se describe a continuación.

Se inoculó con 100 μL de conserva de la cepa *P. pastoris* KM71-FTEII ($\text{DO}_{600}=100$) un tubo de medio de YPD dejando agitar por 15 h a $30^\circ\text{C}/250$ rpm. Del cultivo anterior se determinó la DO_{600} y en base a ella se calculó el volumen de medio para inocular 25 mL de BMGY a densidad óptica inicial de 0.1 (Ecuación 4) en un matraz de 250 mL, el cultivo se incubó durante 24 h a $30^\circ\text{C}/250$ rpm.

$$V_i = \frac{(\text{DO}_{600f})(V_f)}{\text{DO}_{600i}}$$

Ecuación 4. Cálculo del volumen de inóculo inicial.

- V_i : Volumen a inocular (mL).
- V_f : Volumen del medio de cultivo (mL).
- DO_{600i} : Densidad óptica del inóculo.
- DO_{600f} : Densidad óptica del cultivo inicial.

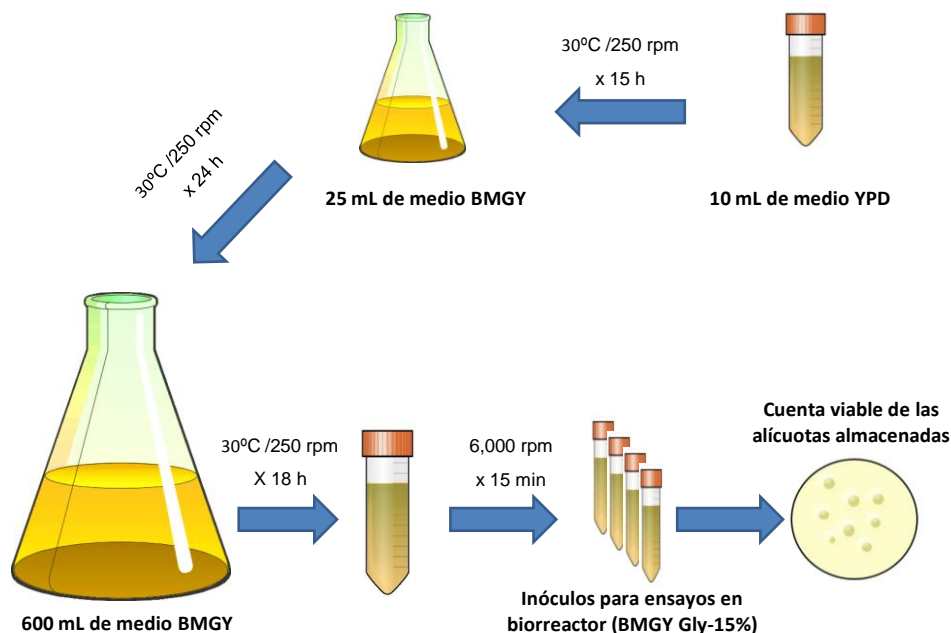


Figura 11. Metodología para la obtención de inóculos.

El cultivo previo se utilizó para inocular 600 mL de BMGY (0.1 DO₆₀₀ inicial) en un matraz de 6 L, se cultivó durante ~18 h hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 13. Se recolectó el medio de cultivo en un vaso estéril de 1 L, se transfirió a tubos cónicos de 50 mL en condiciones de esterilidad y se centrifugaron a 6000 rpm por 15 min. Los paquetes celulares obtenidos se resuspendieron en 100 mL de medio de conservación BMGY-glicerol 150 g/L, se determinó la DO₆₀₀ de la suspensión obtenida y se dividió en alícuotas de 13 mL en tubos cónicos de 15 mL y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Para verificar la viabilidad de los inóculos almacenados a -20°C, se llevó a cabo una cuenta viable de una de las alícuotas mediante el método de dilución y siembra de gota en placa. Se realizaron diluciones sucesivas en buffer de fosfatos 1 M pH 6.0, se inocularon placas de Petri con medio YPD agar con tres gotas de 20 µL de las últimas dos diluciones (generalmente 10⁶ y 10⁸) y se incubaron a 30°C durante 48 h. Para el conteo de células viables, de las dos diluciones sembradas se seleccionó aquella que presentó el mayor número de colonias y que éstas estuvieran lo suficientemente separadas para poder contarlas con facilidad, se calculó el promedio de las tres gotas contadas. Para obtener las UFC/mL del cultivo original y se realizó un cálculo aplicando el número de colonias por su factor de dilución entre el volumen del inóculo-gota (0.02 mL).

5.3.4.2 Cultivo de lote con glicerol

Se esterilizó en un autoclave el vaso de 5 L del biorreactor conteniendo 2 L de medio de sales basales (FBS) y glicerol (por litro: 26.7 mL H₃PO₄ al 85%, 0.93 g de CaSO₄-2H₂O, 18.2 g K₂SO₄, 14.9 g MgSO₄-7H₂O, 4.13g KOH y 50 g de glicerol), después de esterilizado y una vez instalado el vaso en el biorreactor, la temperatura en el medio de cultivo fue ajustada a 30°C, la aeración a 5 L/min y el pH a 5 con una solución de NH₄OH al 30%. Antes de proceder a la inoculación, se añadieron al medio de cultivo 8.8 mL de biotina 500 X (0.02% concentración final), 8.8 mL de PTM1 (CuSO₄ 24 mM, NaI 0.53 mM, MnSO₄ 19.87 mM, Na₂MoO₄ 0.83 mM, H₃BO₃ 0.32 mM, CoCl₂ 2.10 mM, ZnCl₂ 0.15 mM, FeSO₄ 0.23 mM) y 250 µL de antiespumante 289 (*Sigma-Aldrich Co*). El medio de cultivo se inoculó con una alícuota de 13 mL de inóculo previamente

preparado. Esta etapa del cultivo se llevó a cabo bajo las condiciones antes mencionadas, hasta que se agotó la fuente de carbono (glicerol) que fue evidenciado por un aumento brusco del valor del oxígeno disuelto en el medio de cultivo (aproximadamente 19-22 h). Una vez terminada esta etapa se continuó el cultivo durante 45 minutos sin fuente de carbono antes de proceder a la etapa de lote alimentado con glicerol.

5.3.4.3 Cultivo de lote alimentado con glicerol

Esta etapa se realizó durante 9-16 h adicionando glicerol al 50% con 12 mL/L de biotina 0.02% y 12 mL/L de PTM1 a un flujo de 0.5-0.8 mL/min hasta que se completó un volumen aproximado de 420-490 mL de glicerol 50% añadido. Los flujos, volúmenes y tiempos de cultivo variaron en función de la densidad celular a la cual se buscó concluir la etapa, las cuales corresponden a las diferentes densidades celulares planteadas para el diseño experimental Simplex. Toda esta etapa se llevó a cabo a una temperatura constante de 30°C, a un pH de 5 y 800 rpm de agitación. Los flujos, volúmenes y tiempos de cultivo variaron en función de la densidad celular a la cual se buscó concluir la etapa, las cuales corresponden a las diferentes densidades celulares planteadas para el diseño experimental Simplex.

5.3.4.4 Cultivo de lote alimentado con metanol (inducción)

Esta etapa se realizó por 68 h adicionando metanol al 100% conteniendo 12 mL/L de biotina 0.02% y 12 mL/L de PTM1 con una bomba peristáltica. La adición de metanol se llevó a cabo con la ayuda de un sistema regulador ON/OFF de la concentración de metanol en el medio de cultivo. Este sistema está compuesto de dos partes, la primera es un sensor de metanol que detecta la concentración de medio de cultivo y la segunda una bomba peristáltica que está comunicada al sensor de metanol. Así el sensor de metanol detecta la demanda de metanol en el medio de cultivo y la bomba peristáltica alimenta con metanol cada vez que el cultivo se encuentra por debajo de la concentración de metanol deseada. Durante toda esta etapa se mantuvieron las condiciones de cultivo correspondientes a cada experimento del simplex (tablas IV y V).

En los cultivos donde se requirió el sorbitol se añadió en flujo constante de 3.3 g/h administrando una solución de sorbitol al 50% a un flujo constante de 1.1 mL/min.

Al final de esta etapa se recuperó el medio de cultivo utilizando una bomba peristáltica y recuperando a través del puerto de alimentación de fuente de carbono del biorreactor. El medio de cultivo se centrifugó en frascos de poli-estireno de 200 mL a 6,000 rpm/15 min para separar el medio de cultivo libre de células. Posteriormente, este medio de cultivo libre de células fue almacenado a 4°C para su posterior tratamiento.

5.3.4.5 Análisis y control *in situ* (in-line)

El control *in situ* se llevo a cabo por retroalimentación del registro obtenido del biorreactor. De esta forma se mantuvo el control en línea de la temperatura y pH del medio de cultivo.

Durante todo el tiempo de cultivo se registraron tres parámetros *in situ*: el oxígeno disuelto en el medio de cultivo (%), la temperatura en °C y el pH, utilizando el programa computacional FoxyLogic ®. La concentración de metanol en g/L se monitoreo solo durante el tiempo de inducción con ayuda del programa NB208 (PTI instruments inc.) de Windows. Con ayuda de los mismos programas se exportaron los datos del registro a Microsoft ® Excel 2007 y se construyeron los gráficos de estos parámetros a lo largo del tiempo de fermentación.

5.3.4.6 Toma de muestra para el análisis fisiológico en discontinuo (off-line)

A lo largo de todo el cultivo se tomaron muestras a diferentes tiempos (8 mL de muestra por cada toma) estas muestras fueron colocadas en hielo y divididas en tres tubos de 2 mL previamente tarados, se centrifugaron a 6,000 rpm y se separaron las células del medio de cultivo para determinar el peso húmedo. Las muestras libres de células obtenidas de la centrifugación previa fueron almacenadas a -20°C para analizar la actividad de fitasa extracelular, la actividad de proteasas y el porcentaje de secreción de FTEII en el medio de cultivo. El procedimiento se esquematiza en la figura 12. Los paquetes celulares se utilizaron para determinar el peso húmedo y 100 mg de estos se

almacenaron a -20°C para posteriormente utilizarlos en la determinación del porcentaje de secreción de fitasa.

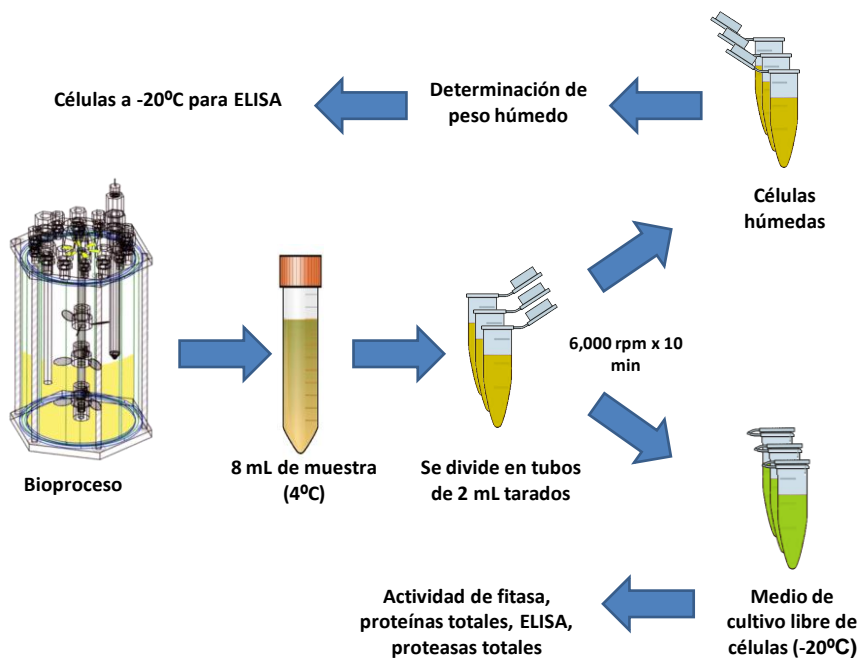


Figura 12. Toma de muestra para análisis en discontinuo.

5.3.5 Determinación y cálculo de producción

5.3.5.1 Determinación de actividad de fitasa

Para medir la producción de fitasa en el medio de cultivo se realizó el método de medición de punto final, midiendo el fósforo liberado del fitato de sodio utilizando el método del ácido ascórbico (Fiske y Subarrow, 1925). y estándares de fosfato monobásico de potasio. Se consideró una unidad de fitasa a la cantidad de enzima que cataliza la liberación de $1\ \mu\text{mol}$ de fosfato en un minuto bajo las condiciones del ensayo (Fitato de sodio $1.6\ \text{mM}$, CaCl_2 $1\ \text{mM}$, $100\ \text{mM}$ Tris-HCl (pH 7.5) a 37°C por 30 min.).

Desalado de sobrenadantes

Cada muestra fue desalada previamente usando cromatografía de exclusión molecular. Para el desalado se lavó previamente una columna PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) con 25 mL de solución amortiguadora (Tris-HCl 100 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM y glicerol 2%) y se eluyó por gravedad hasta descartar la totalidad de la solución. Luego 1000 µL de la muestra (medio de cultivo libre de células) fueron diluidos a un volumen de 2,500 µL con la misma solución amortiguadora, diluyéndola 2.5 veces. Esta mezcla fue colocada en la columna y se eluyó por gravedad hasta que el total de la muestra entró completamente en la resina de la columna. Después se agregó a la columna 3,500 µL de solución amortiguadora y se eluyó por gravedad colectando toda la fase móvil que eluyó de la columna hacia un tubo cónico de 15 mL. La muestra desalada fue almacenada a -20°C (Fig. 13).

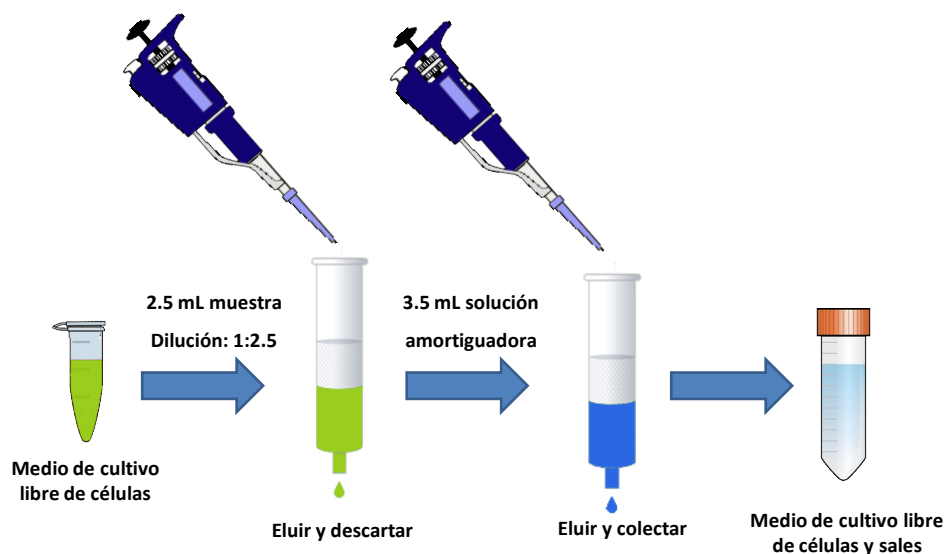


Figura 13. Cromatografía de exclusión molecular para desalar las muestras.

Actividad volumétrica y extracelular total de fitasa

El análisis se llevó a cabo diluyendo previamente (dilución dependiendo de la cantidad de fitasa) cada muestra (fase móvil del desalado) con solución amortiguadora (Tris-HCl 100 mM (pH 7.5), 1 mM CaCl_2) para reducir la cantidad de enzima en la reacción. La reacción enzimática se llevó a cabo mezclando 40 μL de la muestra diluida previamente con 60 μL (proporción 2:3) de solución de sustrato (fitato de sodio 1.6 mM, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM CaCl_2) y se incubó en baño María a 37°C durante 30 minutos. La reacción fue detenida añadiendo 100 μL de ácido tricloroacético 15% a la mezcla anterior (proporción 1:1) se midió la liberación del fosfato inorgánico. La reacción colorimétrica se llevó a cabo añadiendo 200 μL de la dilución anterior y 800 μL de una solución colorante (agua ultrapura, ácido ascórbico 10%, molibdato de amonio 2.5%, ácido sulfúrico 6 N, proporciones 2:1:1:1). Esta mezcla fue incubada por 40 min a 37°C. Se midió la absorbancia de las muestras a 820 nm en un espectrofotómetro y se obtuvo la cantidad de fósforo liberado del fitato interpolando el valor de la absorbancia obtenida en la recta de calibración (Fig. 15).

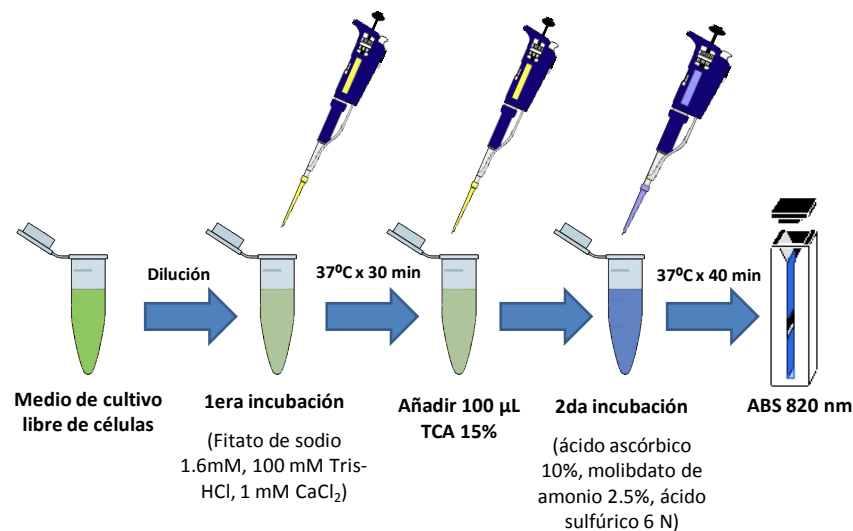


Figura 14. Determinación de actividad de fitasa.

Se analizaron todas las muestras colectadas durante el lote alimentado con metanol. Se consideró una unidad de fitasa a la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μmol de fosfato en un minuto bajo las condiciones del ensayo realizado. Las unidades de la Fitasa FTEII se calcularon en base a la ecuación 5:

$$A_{vf} = \left[\left(\frac{(P)10}{PM_p \times t} \right) FD \right] 1000$$

Ecuación 5. Cálculo de actividad de fitasa.

- A_{vf} : Actividad volumétrica de fitasa en U/L
 P : Fósforo liberado durante la reacción enzimática (μg).
 10 : Factor de conversión (inverso del volumen de muestra usado en la reacción enzimática en mL).
 FD : Factor de dilución de la muestra.
 PM_p : Peso atómico del fósforo (g/mol).
 t : Tiempo de incubación de la reacción enzimática (min).

Para calcular la actividad extracelular total de fitasa (A_{etf}) en el medio de cultivo se utilizó la ecuación 6.

$$A_{etf} = \left[\left(\frac{1 - (DC_{ps})(3.6)}{1000} \right) V_{tmc} \right] A_{vf}$$

Ecuación 6. Cálculo de actividad extracelular total de fitasa.

- A_{etf} : Actividad extracelular total de fitasa.
 DC_{ps} : Densidad celular en peso seco en g/L.
 3.6 : Volumen celular de *P. pastoris* por células en peso seco (mL/g).
 V_{tmc} : Volumen total del medio de cultivo.
 A_{vf} : Actividad volumétrica de fitasa en U/L.

Por último, en base a la actividad de cada muestra tomada a diferente tiempo de cultivo y con ayuda del programa Microsoft Excel 2007, se construyó un gráfico la actividad de fitasa extracelular durante el tiempo de inducción con metanol.

5.3.6 Determinación de parámetros relacionados con la respuesta fisiológica del hospedero

5.3.6.1 Determinación de la demanda de metanol

El registro en línea del metanol añadido se realizó de manera manual en una hoja de cálculo de Microsoft Excel ® anotando el valor de metanol añadido en mL registrado en el panel de la bomba peristáltica de alimentación de metanol junto a su respectivo tiempo de inducción en horas.

En base a estos datos se elaboraron curvas de adición o demanda de metanol (D_M), graficando el metanol añadido (mL) contra tiempo de inducción (h). Esta curva se ajusta a un polinomio de segundo grado, de la cual se calcula la pendiente que representa la velocidad (V_{DM}) de adición o demanda de metanol (mL/min) en cada punto muestreado utilizando la ecuación 7.

$$V_{DM} = [2(at) + b]/60$$

Ecuación 7. Cálculo de la velocidad de adición o demanda de metanol.

- V_{DM} : Velocidad de demanda de metanol mL/min.
- a : Constante del término de segundo grado en el polinomio 2do. grado
- b : Constante del término del primer grado en el polinomio 2do. grado
- t : Tiempo de inducción en horas.
- 60 : Factor de conversión de horas a minutos.

5.3.6.2 Determinación de biomasa y densidad celular

En tubos de 2 mL previamente tarados, se añadieron 2 mL de muestra directa del biorreactor, se centrifugaron a 6,000 rpm durante 10 min, se decantaron los sobrenadantes y se pesó el paquete celular en una balanza analítica (Fig. 15). El peso húmedo (x_{ph}) se calculó como la diferencia entre el peso del tubo lleno con el paquete celular menos el peso del tubo vacío. El valor del peso húmedo o biomasa (x_{ph}) obtenido se empleó para calcular la densidad celular en peso seco (DC_{ps}) en g/L usando

la ecuación 8. Con los valores obtenidos a lo largo del tiempo se construyó un gráfico de densidad celular contra el tiempo de fermentación.

$$DC_{ps} = \left(\frac{x_{ph}}{V_m} \times 0.25 \right) 1000$$

Ecuación 8. Cálculo de la densidad celular

- DC_{ps} : Densidad celular en peso seco en g/L.
 x_{ph} : Biomasa en peso húmedo de células en g.
 V_m : Volumen de la muestra en mL (2 mL).
 0.25: Factor de conversión de peso húmedo a peso seco.
 1000: Factor de conversión de mg/L a g/L.

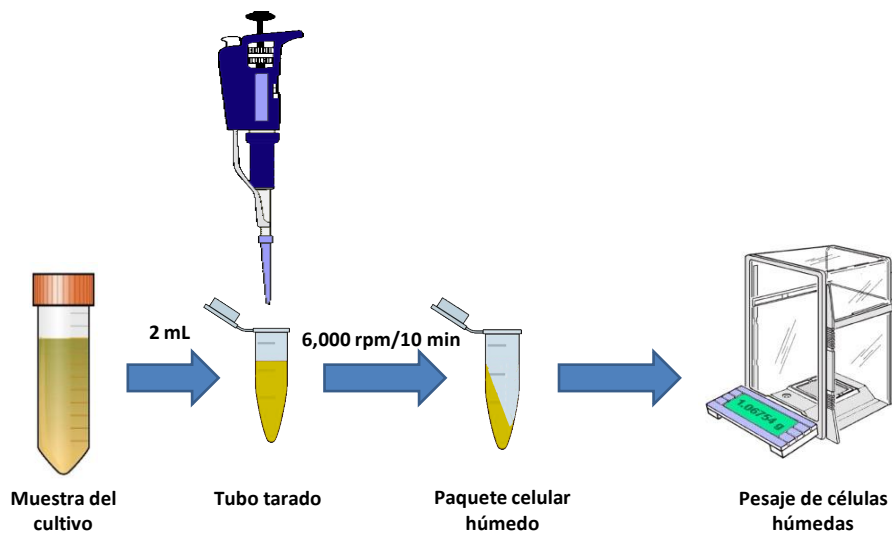


Figura 15. Determinación analítica de biomasa en peso húmedo.

5.3.6.3 Determinación de la velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento (μ) en la etapa de inducción con metanol se calculó a partir de la pendiente del gráfico logarítmico natural del peso seco total de células en gramos (densidad celular \times volumen del cultivo) contra el tiempo de

inducción en horas. Para cada punto analizado, se estimó el volumen del cultivo a partir de la suma del volumen inicial, los volúmenes añadidos de hidróxido de amonio, glicerol, metanol y sorbitol al tiempo analizado, menos el volumen de cultivo muestreado.

5.3.6.4 Rendimiento de la producción de fitasa extracelular por biomasa

El rendimiento del producto por unidad de biomasa, $Y_{p/x}$, fue determinado a las 68 h de inducción a considerando la producción de fitasa extracelular (A_{etf}) sobre biomasa en base a la ecuación 9.

$$Y_{p/x} = (A_{etf}) / (x)$$

Ecuación 9. Calculo de rendimiento producto por unidad de biomasa.

$Y_{p/x}$: Rendimiento de producto por unidad de biomasa (U/g de biomasa).

A_{etf} : Actividad extracelular total de fitasa (ecuación 5.5).

x : Biomasa en peso seco (g).

5.3.6.5 Rendimiento celular debido al consumo de metanol

El cálculo del rendimiento celular sobre consumo de metanol ($Y_{x/s}$) se realizó a las 68 h de cultivo en base a la ecuación 10.

$$Y_{x/s} = \frac{(x_o - x_f)}{V_{MeOH}}$$

Ecuación 10. Rendimiento celular sobre consumo de metanol.

$Y_{x/s}$: Rendimiento celular por consumo de metanol en g/L de metanol.

V_{MeOH} : Volumen de metanol añadido en L.

x_o : Biomasa en peso seco al inicio de la inducción (g).

x_f : Biomasa en peso seco a las 68 h de inducción (g).

5.3.6.6 Rendimiento de la producción de fitasa extracelular por consumo de metanol

Para calcular el rendimiento de la producción de fitasa extracelular debido al consumo de metanol ($Y_{p/s}$) se realizó estimando el cociente de la actividad total de fitasa A_{etf} en el medio de cultivo libre de células (ecuación 6) sobre los litros totales añadidos de metanol al tiempo de inducción evaluado (ecuación 11).

$$Y_{p/s} = \frac{A_{etf}}{V_{MeOH}}$$

Ecuación 11. Rendimiento de producción de fitasa extracelular por consumo de metanol.

$Y_{p/s}$: Rendimiento de producción de fitasa extracelular por consumo de metanol.
 A_{etf} : Actividad extracelular total de fitasa (ecuación 6).
 V_{MeOH} : Volumen de metano añadido en L

5.3.6.7 Determinación de actividad de proteasas totales

La actividad de proteasas totales se determinó directamente del medio de cultivo de células midiendo la formación de aminas primarias a partir de las proteínas presentes en el medio de cultivo después de incubar muestras diluidas con agua a la temperatura y pH del cultivo (15-30°C, pH 3-7) por 2, 4, y 6 h. La reacción se realizó añadiendo un tercio del volumen de 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBSA) al 0.03% (Habeeb, 1966) en una solución amortiguadora de boratos (50 mM, pH 8.5), y se llevó a cabo una incubación posterior a 30°C por 30 min, seguido por la medida de la absorbancia a 450 nm. La cantidad de producto generado se calculó con el coeficiente de absorción molar del derivado TNBSA-amina (20,000 M⁻¹ cm⁻¹). La actividad de proteasas se determinó a partir de la pendiente de la regresión lineal de μmol TNBSA-amina contra el tiempo (en minutos). Se consideró como una unidad de proteasa a la cantidad de proteasas requerida para generar 1 μmol de derivado TNBSA-amina por min bajo las condiciones del ensayo (figura 16).

Para la reacción específica, se mezclaron 150 μL de medio de cultivo libre de células con 150 μL de buffer de fosfatos (100 mM pH 6) y 150 μL de agua ultrapura. Esta mezcla se incubó a 30°C durante 0, 2, 4 y 6 h (para cada tiempo se realizaron por duplicado) para llevar a cabo la reacción enzimática. Después de la incubación, se añadieron a la mezcla 150 μL de TNBSA 0.03% (Boratos 50 mM, pH 8.5). Luego de 30 min de incubación a 30°C se determinó la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro de luz visible a 450 nm. Para cada mezcla de reacción se incubó además un blanco conteniendo 300 μL de agua ultrapura, 150 μL de buffer de fosfatos (100 mM pH 6) y 150 μL de TNBSA 0.03%. La absorbancia del blanco se le resta a la absorbancia de la mezcla en caso de ser necesario (absorbancia del blanco >0).

En base a la absorbancia de la muestra se calcularon los micromoles de producto formado despejando de la ecuación de Lambert-Beer (ecuación 12).

$$\text{TNBSA} - \text{amina} = (\text{ABS}_{450 \text{ nm}}) \left(\frac{V_{\text{Rxn}}}{\epsilon l} \right)$$

Ecuación 12. Cálculo de TNBSA-amina formado.

TNBSA – amina :	μmol de producto formado.
$\text{ABS}_{450 \text{ nm}}$:	Absorbancia de la muestra a 450 n
V_{Rxn} :	Volumen de la mezcla de reacción (600 μL).
ϵ :	Coefficiente de extinción molar del TNBSA (20,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).
l :	Longitud de la celda (1 cm).

Con los micromoles de producto formado por tiempo de incubación se graficó una línea recta cuya pendiente equivale a las unidades totales de proteasas en la reacción, en base a esta se calculó la actividad de proteasas extracelulares en mU/L de proteasas totales usando la ecuación 13.

$$AP_e = \left(\frac{U}{V_{MRxn}} \right) (1000)(1000)$$

Ecuación 13. Cálculo de actividad de proteasa extracelular.

- AP_e : : Actividad de proteasa extracelular en en mU/L.
 V_{MRxn} :: Volumen de la muestra en la mezcla de reacción (0.15 mL).
 1000: Factor de convesión de mL a L.
 1000: Factor de convesión de U a mU.

Los valores de AP_e en mU/L se graficaron contra el tiempo de inducción (h) con ayuda de Microsoft Excel 2007.

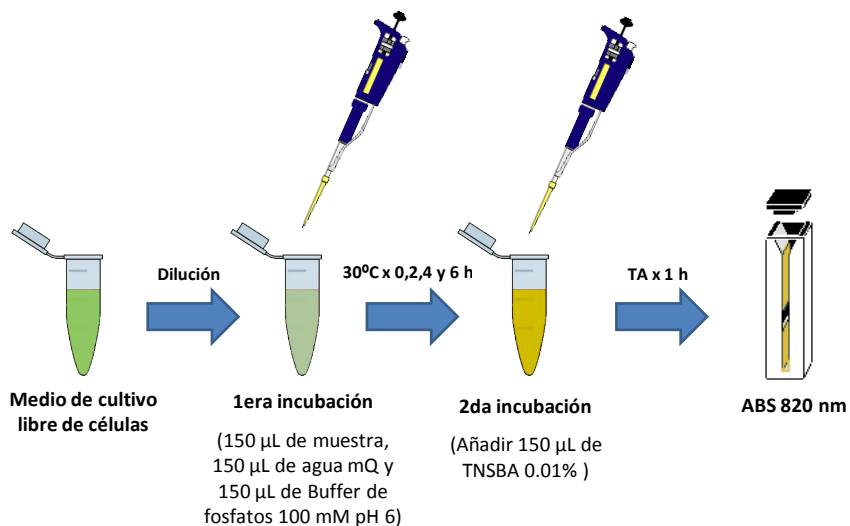


Figura 16. Determinación de proteasas totales en el medio de cultivo.

5.3.6.8 Determinación de niveles de secreción de fitasa por ELISA

El porcentaje de secreción de fitasa al medio de cultivo se determinó a través de la relación de la concentración de fitasa extracelular/intracelular, ambas determinadas por un método ELISA directo desarrollado por nuestro grupo de trabajo (Fig. 17). Como anticuerpo primario se empleó un anticuerpo policlonal anti-fitasa FTEII, adquirido de la compañía GenScript Corporation (Scotch Plains, NJ), sintetizado en conejo usando un péptido sintético conjugado a la hemocianina de la lapa *Megathura crenulata* (KLH) y purificado por cromatografía de afinidad usando el péptido sintético como ligando. Como segundo anticuerpo se empleó un anti-IgG de conejo policlonal producido cabra conjugado a una fosfatasa alcalina que desarrolla color con absorción a 420 nm al reaccionar con p-nitrofenolfosfato (PNPP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El revelado se realizó con PNPP. Como estándar de calibración se usó FTEII purificada por cromatografía de intercambio aniónico en el intervalo de 1 a 11 mU/mL (75-827 ng/mL). Como muestra intracelular se utilizó un extracto de proteínas obtenido de la lisis celular de cada uno de los tiempos de inducción y como muestra extracelular se utilizó medio de cultivo libre de células. La metodología detallada se describe a continuación.

Anticuerpo primario

El anticuerpo primario IgG anti-FTEII se sintetizó dirigido contra un péptido antigénico que se encuentra en la superficie de la FTEII así como de otras fitasas tipo β -Propeller.

Estándares para la curva de calibración

Para tener valores de referencia de los cuales determinar la cantidad de FTEII en las muestras se purificó FTEII por cromatografía de intercambio aniónico (Viader-Salvadó et al., 2010). Se inyectó 1 mL de FTEII concentrada y desalada (108.6 U totales) en una columna de intercambio aniónico HiTrap QFF[®] (Amersham bioscience). Se corrió un gradiente como se muestra en la tabla VI.

Las fases móviles utilizadas para la mezcla del gradiente fueron: Tris-HCl 25 mM, CaCl₂ 1 mM y Tris-HCl 25 mM, CaCl₂ 1 mM, NaCl 500 mM. Se colectó la

fracción correspondiente a 300 mM de NaCl y se le determinó la cantidad y la pureza de fitasa (22.3 U/mL y 10.5 U/mg). De esta fracción se hicieron alícuotas de 20 μ L y se guardaron a -20°C para utilizarlo como estándar madre de concentración conocida de fitasa en la prueba de ELISA.

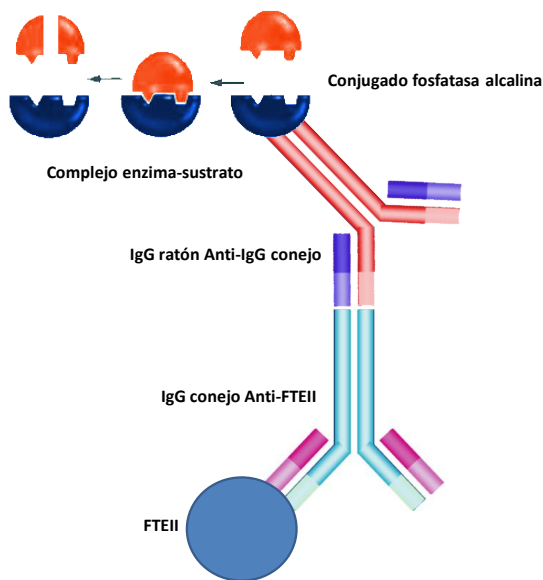


Figura 17. Fundamento del ELISA directo usado para la determinación.

Para preparar la curva de calibración se diluyó el estándar stock dos veces en buffer de carbonatos pH 9.5 (Por litro: 2.93 g de NaHCO_3 y 1.59 g de Na_2CO) primero 1:10 y luego 1:100 para dejarlo a una concentración de fitasa de 22.3 mU/mL, posteriormente esta nueva solución madre se mezcló como se muestra en la tabla VII para obtener la curva de calibración.

Tabla VI

Gradiente de intercambio aniónico.

Tiempo (min)	NaCl (mM)
0-10	0
10-11	0-25
11-17	25
17-18	25-175
18-24	175
24-25	175-300
25-31	300
31-33	300-500
33-43	500
43-53	500-0
53-63	0

Tabla VII

Curva de calibración para la determinación por ELISA.

Estándar (mU/mL)	Solución stock 22.3 mU/mL (μL)	Buffer de Carbonatos (μL)
1	50.0	950.0
5	200.0	800.0
7	333.3	667.7
11	500.0	500.0

Para obtener la recta de calibración se graficó la concentración del estándar contra la absorbancia obtenida en un intervalo de 1 a 11 mU/mL (75-827 ng/mL).

Preparación de proteínas solubles intracelulares

La preparación de proteínas intracelulares se realizó a partir de una lisis celular con perlas de vidrio. De cada tiempo se obtuvieron 40 mg de células húmedas. El volumen de medio de cultivo para tener 40 mg de peso húmedo se determinó con la ecuación 14.

$$V = \left(\frac{40}{x_{ph}} \right) 1000$$

Ecuación 14. Volumen de medio de cultivo equivalente a 40 mg de peso húmedo.

V Volumen de medio de cultivo (μL).

x_{ph} : Peso húmedo de la muestra (mg/mL).

1000: Factor de conversión de mL a μL.

Al paquete celular se añadieron 40 mg de perlas de vidrio (425-600 μm, Sigma-Aldrich Co.) lavadas en ácido (425-600 μm, Sigma-Aldrich) y 50 μL de buffer de lisis (fosfato de sodio 10 mM pH 7.4 fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 5 mM y ditioneitol, (DTT) 0.1 mM), se homogenizaron a máxima velocidad en un vortex por 30 s y luego se enfrió a 4°C en hielo por 30 s. La homogenización-enfriamiento se repitió 9 veces más para completar 10 ciclos. La mezcla de lisis se centrifugó a 18,000 g por 10 min, se traspasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se le realizó un lavado a la pastilla con 950 μL de buffer de lisis (realizando los 10 ciclos de homogenización-enfriamiento) para posteriormente centrifugar a 18,000 g por 10 min, los 950 μL de sobrenadante se mezclaron con los 50 μL del primer lavado. La solución obtenida se aforó a 1 mL y se guardó a -20°C para la posterior determinación del ELISA (Fig. 18).

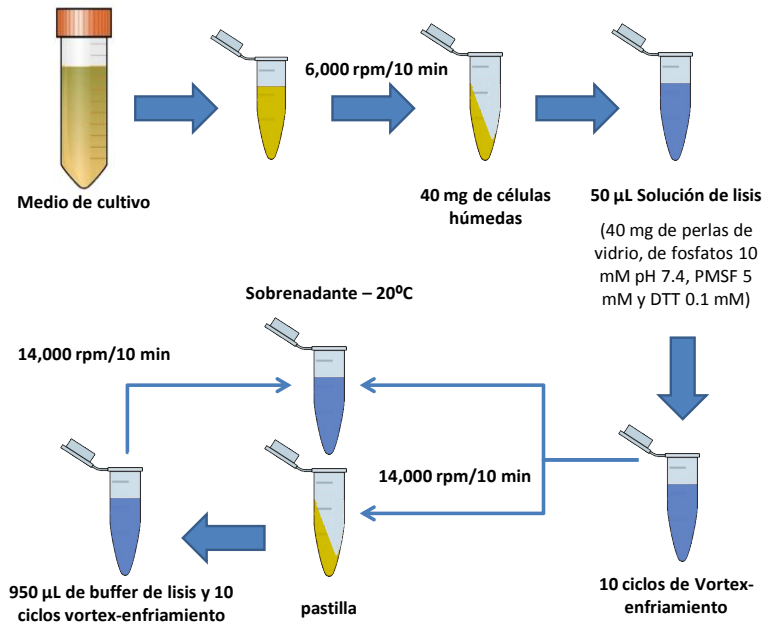


Figura 18. Preparación de proteínas solubles intracelulares

Técnica de ELISA directo

Cada pocillo de una placa MaxiSorp ELISA (Nunc, Roskilde, Dinamarca) de 96 se recubrieron con 100 µL del antígeno (muestra intracelular ó extracelular y estándar). La colocación de las muestras siempre fue como se indica en la figura 19. Las muestras intracelulares fueron diluidas de 500 a 5,000 veces con buffer de carbonatos (carbonato de sodio 50 mM, pH 9.5) y las extracelulares de 10,000 a 50,000 veces (la dilución varió respecto a la cantidad de fitasa en la muestra).

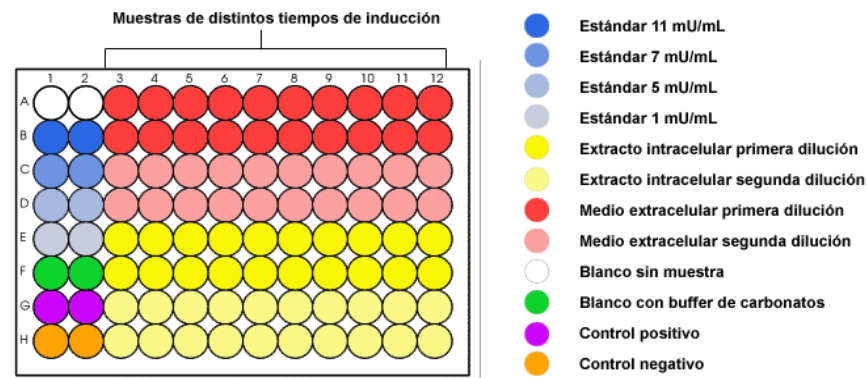


Figura 19. Aplicación de las muestras en los ensayos de ELISA directo.

Después de la aplicación la placa se incubó por dos horas a 37 °C para el tapizado del antígeno (FTEII) en la superficie de la placa, posteriormente la placa se lavó tres veces con TBS (100 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, pH 8) -0.05% Tween 20. Después a todos los pocillos se les aplicaron 100 µL de la solución de bloqueo (TBS, 0.1% Tween 20, 1% albúmina de suero bovino (BSA) y la placa se incubó dos horas a 37°C. De nueva cuenta la placa se lavó tres veces con TBS-0.05% Tween 20 y se aplicaron 100 µL del primer anticuerpo por duplicado a cada pocillo primario diluido 1:5,000 en TBS-0.05% Tween 20-0.2% BSA para luego incubar a 37°C por dos horas. Después de tres lavados, se aplicaron 100 µL de anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo producido en cabra y marcado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich Co.), diluido 1: 30,000 (TBS-0.05% de Tween 20-0.2% BSA) a cada pocillo y la placa se incubó durante dos horas a 37°C.

Las placas se lavaron tres veces y se llevó a cabo el desarrollo de color mediante la adición de 100 µL por pocillo de 0.05% p-nitrofenilfosfato (PNPP, Sigma-Aldrich Co.) en 10% de trietanolamina (pH 9.5). Por último la placa se lavó tres veces y se dejó secar completamente para luego aplicar 100 µL por pocillo de la solución de revelado (0.05% p-nitrofenilfosfato (PNPP, Sigma-Aldrich Co.) en 10% de trietanolamina, pH 9.5) y después se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente por 90 min. La lectura se llevó a cabo a 420 nm en un lector de de microplacas 500 de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y utilizando como blanco los pocillos sin muestra (Fig. 19). Como estándar de calibración se usó FTEII purificada en el intervalo de 1 a 11 mU/mL (75-827 ng/mL).

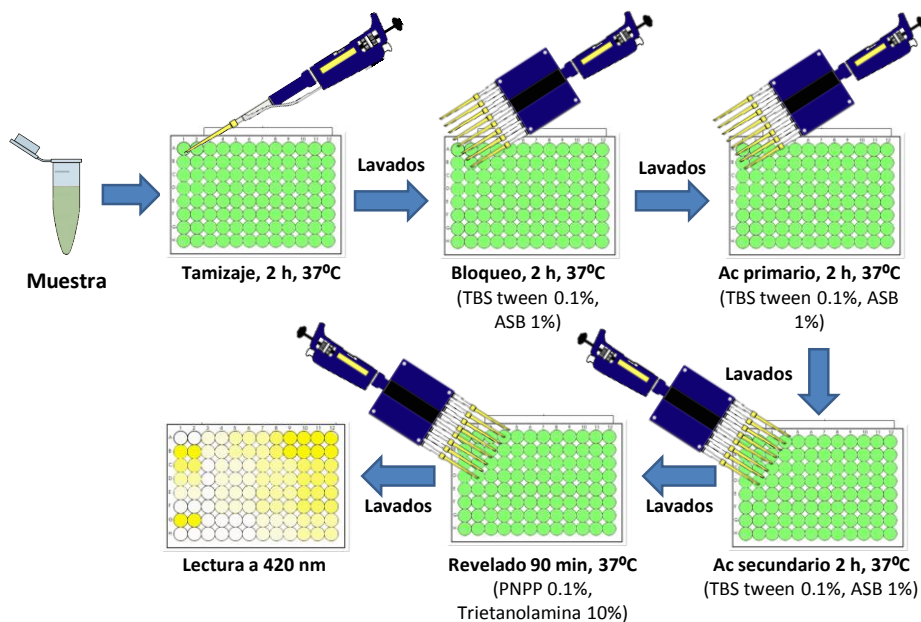


Figura 20. Protocolo del ELISA directo.

A partir de la absorbancia determinada a 420 nm se calculó la concentración de FTEII en cada muestra en mU/mL utilizando la ecuación 15.

$$[FTEII] = \left(\frac{(ABS_{420nm} - b)}{m} \right) FD$$

Ecuación 15. Cálculo de la concentración de FTEII en la muestra.

- [FTEII]: Concentración de FTEII en la muestra en mU/mL.
- b: Intersección en y de la recta de calibración
- m: pendiente de la recta de calibración
- FD: Factor de dilución de la muestra.
- ABS_{420nm} : Valor de absorbancia a 420 nm

Para determinar el porcentaje de FTE liberada del espacio intracelular al medio de cultivo libre de células se calculó la concentración de las muestras intracelular y extracelular. Para el cálculo de la concentración de FTEII extracelular en mU/mL se

empleó la ecuación 15 previamente descrita, mientras que para la preparación intracelular se utilizó e la ecuación 16, la cual incluyó el peso de las células húmedas utilizadas para el extracto y el peso húmedo de esa muestra.

$$[FTEII]_i = \left[\frac{\left(\frac{ABS_{420nm} - b}{m} \right) (FD) \times (V_m)}{40 \text{ mg}} \right] DC$$

Ecuación 16. Cálculo de la concentración de FTEII intracelular.

- [FTEII]_i: Concentración de FTEII intracelular por volumen de cultivo (mU/mL).
 b: Intersección en y de una curva de calibración semi-logaritmica
 m: Pendiente de la curva de calibración semi-logaritmica
 V_m: Volumen de la preparación intracelular (1 mL).
 FD: Factor de dilución de la muestra.
 DC: Densidad celular en peso humedo (mg/mL).
 40: Peso húmedo de biomasa utilizada para la preparación de proteínas solubles intracelulares (mg).
 ABS_{420nm}: Valor de absorbancia a 420 nm

Por último, para obtener el porcentaje secretado de FTEII se utilizo la ecuación 5.15.

$$\%FTEII_{ec} = \frac{(100\%)([FTEII]_{ec})}{([FTEII]_{ec} + [FTEII]_{ic})}$$

Ecuación 17. Porcentaje de secreción de FTEII.

- %FTEII_{ec} Porcentaje de FTEII secretada al medio de cultivo.
 [FTEII]_{ec}: Concentración de FTEII extracelular en mU/mL
 [FTEII]_{ic}: Concentración de FTEII intracelular en mU/mL

Con los porcentajes obtenidos se realizó un gráfico de porcentaje de secreción contra el tiempo de inducción (h) con ayuda de Microsoft Excel 2007.

5.4 Análisis de la expresión de genes involucrados en la producción y secreción de la fitasa recombinante y correlación con la respuesta fisiológica del hospedero y con la producción extracelular del producto recombinante. Etapa 2.

Con el objetivo de evaluar el impacto del proceso de optimación en la respuesta fisiológica del hospedero, y su correlación con los niveles de expresión de genes involucrados en la producción y secreción de la fitasa recombinante se implementaron y estandarizaron protocolos experimentales para el análisis de los niveles de expresión de siete genes involucrados en la producción y secreción de la fitasa recombinante. Los genes seleccionados (Tabla VIII) fueron el gen *FTEII* que es el gen heterólogo de la cepa *P. pastoris* estudiada (KM71FTEII), tres genes de proteasas vacuolares (*PEP4*, *PRB1* y *PRC1*), un gen responsable del metabolismo del metanol en las KM71 de *P. pastoris* (*AOX2*), un gen de una proteasa (*KEX2*) que participa en el procesamiento postraduccional para la secreción de la proteína recombinante, y un gen (*KAR2*) que codifica para una chaperona del retículo endoplásmico. Además, se seleccionaron tres genes normalizadores reportados como constitutivos en *P. pastoris* (*GAP*, *G6PD*, y *YPT1*). Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de los siete genes en células KM71FTEII de *P. pastoris* cultivadas bajo dos condiciones de cultivo diferentes, una de baja y otra de alta producción extracelular de la fitasa FTEII a cinco distintos tiempos de inducción.

5.4.1 Diseño de experimentos

La estrategia experimental seguida para llevar a cabo este análisis se resume en la Fig. 21. De los cultivos de optimización (diseño experimental Simplex, sección 5.3.3) se consideraron para este estudio los cultivos de menor y mayor producción de fitasa FTEII extracelular. Se hicieron nuevos inóculos de la cepa de *P. pastoris* KM71-FTEII. De cada condición se hicieron cultivos por triplicado en fermentador de 5 L. Para cada cultivo se determinaron los parámetros fisiológicos antes ya descritos, consumo de metanol, la velocidad específica de crecimiento (μ), el rendimiento celular proveniente de metanol ($Y_{x/s}$), el rendimiento de la producción extracelular de fitasa/biomasa ($Y_{p/x}$), el rendimiento de la producción extracelular de fitasa proveniente de metanol ($Y_{p/s}$), la actividad de proteasas en el medio de cultivo libre de células, el porcentaje de secreción

de fitasa al medio de cultivo, y la velocidad específica de consumo de metanol (q_s) y la actividad de proteasas extracelular. Para llevar a cabo un análisis de los niveles de expresión de genes se tomaron muestras de cada cultivo a 5 tiempos de inducción (0, 22, 30, 47 y 68 h) para la preparación de RNA total. El RNA total fue utilizado para obtener cDNA mediante retro-transcripción de alta fidelidad con el cual se hizo PCR cuantitativa (qPCR) para determinar el número relativo de transcritos totales de los siete genes analizados (Tabla VIII). Para los 10 genes se diseñaron oligonucleótidos específicos para realizar la qPCR, para el gen FTEII y GAP se diseñó además una sonda de hidrólisis específica. Los genes GAP, G6PD, y YPT1 reportados como constitutivos en *P. pastoris* se utilizaron como genes normalizadores. Para la estimación de los niveles de expresión se realizó el cálculo de la expresión relativa utilizando el método conocido como $2^{-\Delta\Delta C_t}$, empleando como genes normalizadores a los genes GAP, YPT1 y G6PD y como muestras calibratoras a las muestras de los tiempos de inducción de 0 h. Se correlacionó el estudio de los parámetros fisiológicos con los niveles de expresión de los 7 genes estudiados.

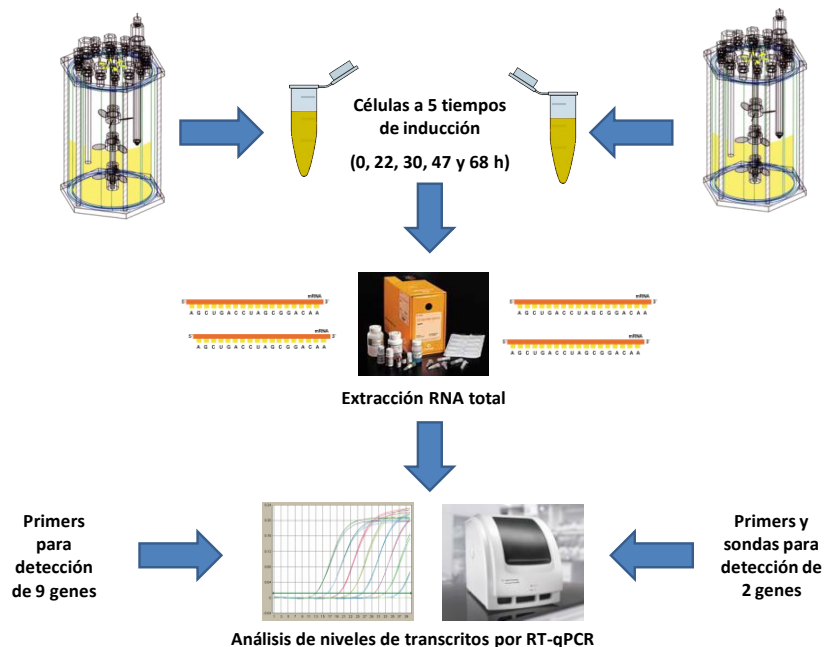


Figura 21. Estrategia general para medir la expresión relativa de genes.

5.4.2 Selección de genes y diseño de oligonucleótidos específicos y sondas de hidrólisis

Se seleccionaron un total de siete genes relacionados con las rutas metabólicas de proteólisis, secreción y metabolismo del metanol: el gen *AOX2*, que codifica para la enzima AOX2, responsable del metabolismo del metanol en las cepas KM71 de *P. pastoris*; el gen *PEP4*, gen que codifica para la proteinasa A, principal proteasa aspártica vacuolar en *P. pastoris*; el gen *PRB1*, que codifica para la proteinasa B, principal serín-proteasa vacuolar en *P. pastoris*; el gen *PRC1*, que codifica para la carboxipeptidasa Y, proteasa vacuolar que procesa el extremo C-terminal de proteínas; el gen *KEX2*, que codifica para la proteasa KEX2, involucrada en el procesamiento del propéptido del factor alfa de *S. cerevisiae*; el gen *KAR2*, que codifica para la chaperona BiP, proteína principal responsable del plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico; y el gen *FTEII*, que codifica para la fitasa FTEII clonado en la cepa KM71FTEII de *P. pastoris*. Además, como genes normalizadores se seleccionaron tres genes reportados como constitutivos en *P. pastoris*: el gen *GAP*, que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, enzima de la glicólisis; el gen *G6PD*, que codifica para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima de la vía de las pentosas fosfato; y el gen *YPT1*, que codifica para una GTPasa implicada en el proceso de secreción.

Se diseñaron un total de diez pares de oligonucleótidos específicos en base a las secuencias nucleotídicas reportadas en GenBank y empleando el programa ProbeFinder de Roche Applied Science (<http://www.probefinder.com>) o bien el programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). El programa se alimentó con las secuencias obtenidas previamente en el GenBank para obtener las secuencias de los oligonucleótidos específicos 3' y 5' para cada uno de los genes a analizar. Posteriormente, las secuencias de los oligonucleótidos diseñados fueron evaluadas para determinar su especificidad sobre el DNA blanco y la formación de estructuras secundarias.

Para evaluar la especificidad, se realizaron alineamientos utilizando la herramienta en línea blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), alimentando el programa con las secuencias 3' y 5' de cada uno de los oligonucleótidos diseñados y haciendo alineamiento específico contra el genoma de *P. pastoris*, excepto en el

alineamiento con la secuencia de los oligonucleótidos de *FTEII*, para la cual se realizó el alineamiento con la secuencia de una fitasa termoestable sintética diseñada en nuestro laboratorio (Numero de acceso: HM755449). Para determinar la especificidad se tomaron en cuenta tres criterios: hibridación de ambos oligonucleótidos en la misma secuencia, hibridación en cadenas complementarias y que los oligonucleótidos se encontraran a una distancia no mayor a 5,000 pb de distancia. Para evaluar la formación de estructuras secundarias, se realizaron análisis empleando la herramienta en línea OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>), este programa permite analizar la formación de estructuras secundarias de tipo horquilla, homodímeros y heterodímeros, entre otras propiedades. El programa fue alimentado con las secuencias 3' y 5' de cada uno de los oligonucleótidos diseñados y se evaluó el valor de ΔG (kcal/mol). Para determinar que no hubiera formación de estructuras secundarias se evaluó que el valor de ΔG no fuera mayor a -10 kcal/mol, tomando en cuenta las siguientes concentraciones: oligonucleótido 3.3 μM , Na^+ 100 mM, Mg^+ 5.5 mM y dNTPs 1mM. Una vez que se evaluaron las propiedades de los oligonucleótidos nmdiseñados, estos se sintetizaron en la compañía Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, Iowa). Todos los oligonucleótidos fueron diseñados para hibridar en la región CDS de la secuencia de cada gen, excepto en el caso del oligonucleótido para *AOX2*, cuya hibridación fue dirigida a la región 5' no traducible del gen. Además, todos los oligonucleótidos se diseñaron para que la detección de la expresión de los genes se realizara empleando SYBR Green como agente fluorogénico, excepto para los genes *FTEII* y *GAP* cuyo diseño contempló la detección con sondas de hidrólisis con el kit PrimeTime Mini de Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, Iowa), el cual contiene una pareja de oligonucleótidos y una sonda marcada en el extremo 5' con FAM (colorante fluorescente) y en el extremo 3' con ZEN/3' Iowa Black FQ que actúa de quencher.

En la tabla VIII se enlistan los genes seleccionados, método de detección y aplicación.

Tabla VIII

Genes seleccionados para el análisis de expresión por qPCR.

GEN	Método de detección	Gen Seleccionado (GS)/ Gen normalizador (GN)
<i>AOX2</i>	SYBR green	GS
<i>FTEII</i>	Sondas de hidrólisis (FAM)	GS
<i>PEP4</i>	SYBR green	GS
<i>PRB1</i>	SYBR green	GS
<i>PRC1</i>	SYBR green	GS
<i>KEX2</i>	SYBR green	GS
<i>KAR2</i>	SYBR green	GS
<i>G6PD</i>	SYBR green	GN
<i>YPT1</i>	SYBR green	GN
<i>GAP</i>	Sondas de hidrólisis (FAM)	GN

5.4.3 Método de cultivo y análisis de parámetros fisiológicos y producción de fitasa extracelular

En base al diseño experimental de optimización Simplex, se eligieron dos condiciones de cultivo experimentales que generaran alta y baja producción extracelular de fitasa, las cuales correspondieron a las de los cultivos J (temperatura de 24°C, pH 6, densidad celular inicial de 90 g/L de células secas, concentración de metanol en el medio de cultivo de 1.5 g/L y sin sorbitol) y C (temperatura de 30°C, pH 3, densidad celular al inicio de la inducción de 88 g/L de peso seco, concentración de metanol en el medio de cultivo de 0.5 g/L y sin sorbitol), respectivamente.

Para cada condición de cultivo se llevaron a cabo tres cultivos (Fig. 22) independientes siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (sección 5.3.4.), y se

determinó la actividad de fitasa extracelular y los parámetros fisiológicos antes ya descritos (porcentaje de secreción de fitasa, actividad extracelular de proteasas, consumo de metanol y crecimiento celular) a las 68 h de inducción. Además se tomaron muestras de células húmedas a cinco tiempos durante la etapa de inducción (0, 22, 30, 46 y 68 h) y se almacenaron en RNAlater (Fig. 22). Posteriormente 50 mg de células húmedas se lisaron con perlas de vidrio y se extrajo el RNA total empleando el SV Total RNA Isolation System (Promega).

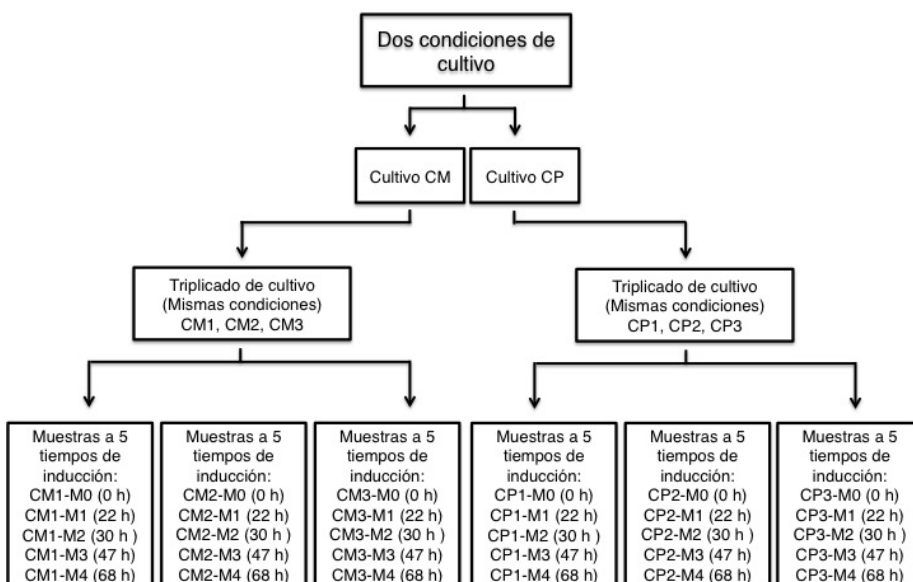


Figura 22. Diagrama de flujo con la estrategia para en análisis de los niveles de expresión relativa de los genes en estudio bajo dos condiciones de cultivo (CM y CP) (Felix Castro, 2013).

5.4.4 Muestreo de cultivos y conservación de células para preparación de RNA total

Para el muestreo de los cultivos se recuperaron muestras de 10 mL de medio de cultivo en tubos de ensayo de 20 x 150 mm en 0, 22, 30, 46 y 68 h de inducción de metanol. Inmediatamente después de la toma las muestras se colocaron a 4°C (en hielo) para su transporte al laboratorio. Para determinar el peso húmedo se determinó de acuerdo a la sección 5.3.6.2. A partir de la densidad celular en g/L, se determinó el volumen de muestra para obtener el total de 50 mg de células en peso húmedo. Para la

conservación de las células, las muestras fueron centrifugadas en tubos de 2 mL a 6,000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C. El paquete celular fue re-suspendido en 500 µL (volumen equivalente a 5 veces el volumen del paquete celular) del reactivo RNAlater del reactivo RNAlater solution ® (Ambion) e incubado durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante. Finalmente, las muestras fueron etiquetadas y almacenadas a 70 °C para su posterior uso (Fig. 23).

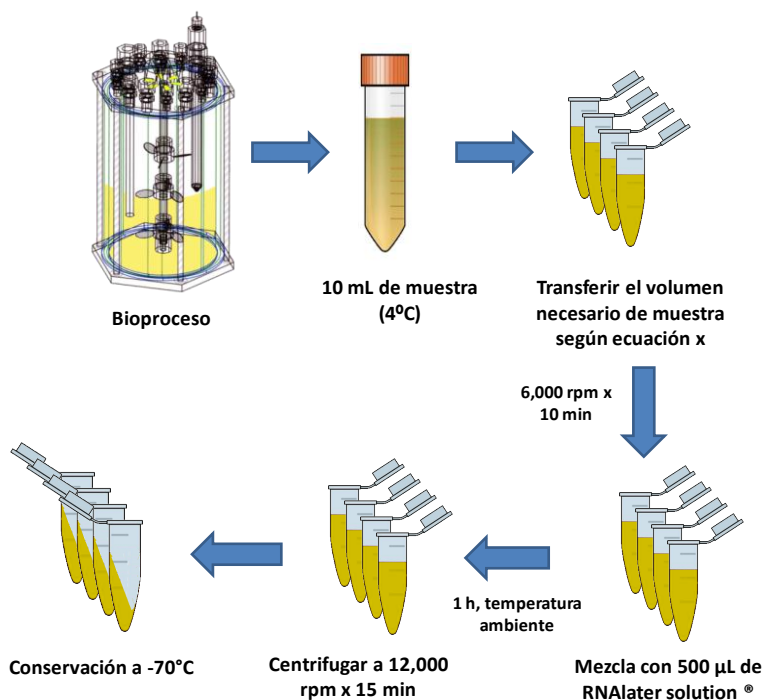


Figura 23. Toma y conservación de muestra para extracción de RNA total.

5.4.5 Obtención de preparaciones de RNA total

En la figura 24 se esquematiza la metodología empleada para la preparación y análisis del RNA. La preparación de RNA total se realizó a partir de 50 mg de células húmedas empleando el SV Total RNA Isolation System (Promega). La cuantificación y calidad del RNA se evaluó por espectrofotometría de luz ultravioleta y mediante el número de integridad del RNA (RIN) con el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

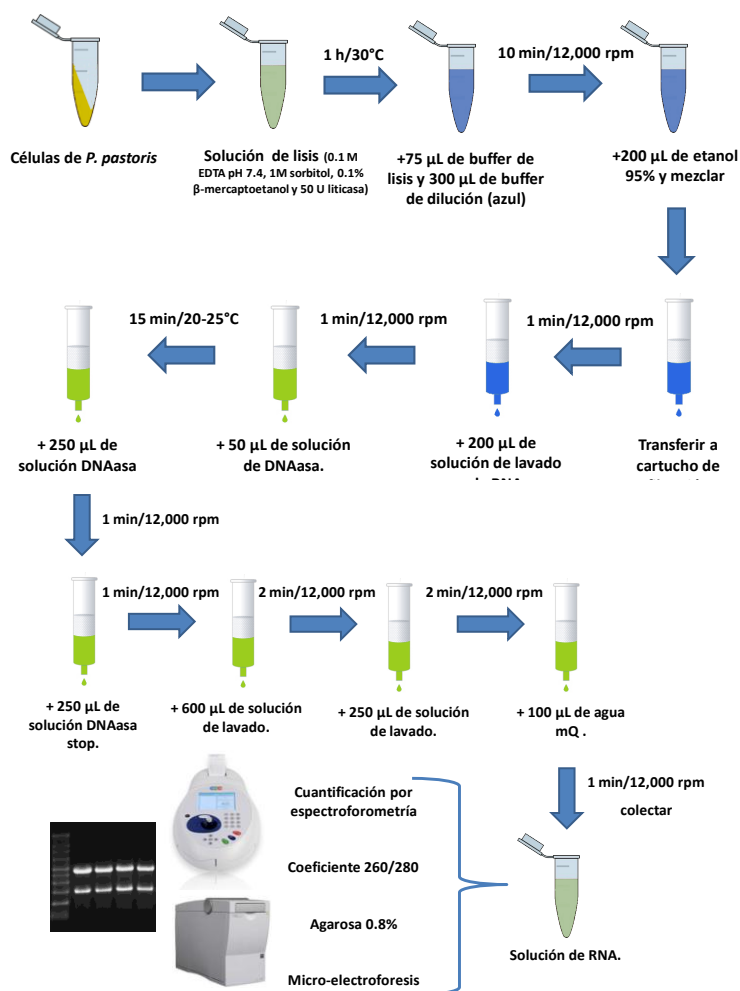


Figura 24. Metodología de la extracción de RNA.

Para la obtención de preparaciones de RNA a partir de las muestras conservadas previamente (punto 5.4.2), se utilizó el Kit de Promega SV Total RNA Isolation System, siguiendo el protocolo del manual de Promega, trabajando en un ambiente libre de polvo u otros contaminantes y utilizando guantes, puntillas, tubos y agua libres de RNasa. Cada preparación de 50 mg de células conservadas en RNAlater solution® fue descongelado y se mezcló con 100 μL de una solución de lisis (0.1 M EDTA (pH 7.4), 1M sorbitol, 0.1% β-mercaptoetanol y 50 unidades de liticasa). La mezcla fue resuspendida mediante vortex a velocidad media durante 5-10 segundos. Las muestras fueron incubadas durante una hora a 30°C en un agitador termoestado (Thermomixer R, Eppendorf) con agitación a 350 rpm células fueron incubadas a 30 °C, durante una

hora para llevar a cabo la digestión de la pared celular. Posteriormente se agregaron 75 μ l de buffer de lisis de RNA (4M TCG, 0.001 M Tris-HCl, 0.97% β -mercaptoetanol) y 300 μ l de buffer de dilución de RNA, se mezcló por inversión y los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C, se separó el sobrenadante (color azul) en un tubo nuevo de 2 mL, se añadieron 200 μ l de etanol 95%, se mezcló por pipeteo, y se transfirió la mezcla a un cartucho de filtración, se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto, a 4 °C y se descartó el líquido del tubo colector. Posteriormente se añadieron 600 μ l de solución de lavado de RNA y se centrifugó a 12,000 rpm, durante 1 minuto, a 4 °C. Una vez terminada la centrifugación, se preparó y añadió al cartucho de filtración la solución de incubación de DNasa (40 μ l de Yellow Core Buffer, 5 μ l de $MnCl_2$ 0.09M y 5 μ l de DNasa I) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego, se agregaron 250 μ l de la solución para desactivar la DNasa y el cartucho se centrifugó a 12,000 rpm, durante 1 minuto a 4 °C. Nuevamente se añadieron 600 μ l de la solución de lavado de RNA, se centrifugó en las mismas condiciones y se descarto el líquido del tubo colector. De nueva cuenta, se añadieron 250 μ l de solución de lavado de RNA y se centrifugó a 12,000 rpm, durante 2 minutos a 4 °C. Por último, se transfirió el cartucho de filtración a un tubo de elución de 1.5 mL y se agregaron 100 μ l de agua libre de nucleasas. Se centrifugó a 12,000 rpm, durante 1 minuto a 4°C. El cartucho de filtración fue desechado y el contenido del tubo colector fue etiquetado y almacenado a -70 °C.

Debido al pH más ácido (pH 3) empleado en el cultivo CP, se realizaron lavados de las células almacenadas en RNA later con PBS 10X antes de iniciar con el protocolo del manual del Kit de Promega SV Total RNA Isolation System. El PBS 10X fue preparado agregando los siguientes reactivos, en orden: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 1.4 mM KH_2PO_4 . Se realizó una dilución del PBS 1:10 (90 ml de PBS 10 \times + 10 ml de Agua DEPC), de la cual se agregaron 500 μ l a cada paquete celular descongelado. El paquete celular fue resuspendido mediante pipeteo y la suspensión centrifugada a 6,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se realizaron tres lavados como el descrito anteriormente, hasta obtener un pH entre 6 y 7. La medición del pH se determinó mediante el uso de tiras indicadoras de pH directamente en los tubos con el paquete celular. Una vez obtenidas las muestras de RNA total se determinó la integridad

del RNA mediante nanoespectrofotometría. Cada tubo de elución fue etiquetado de acuerdo a la nomenclatura establecida y almacenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su posterior procesamiento para la síntesis de DNAC.

El RNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm utilizando un equipo de nano-espectrofotometría (Nanophotometer IMPLÉN). Se colocó 1 μL del RNA sobre el pedestal lector y se tomó como valor de la concentración de RNA directamente de la lectura que arrojó el equipo utilizando como blanco agua libre de nucleasas.

El valor de la absorbancia a 260 nm se dividió entre el valor de absorbancia a 280 nm. El resultado de este cociente debió de ser mayor a 2 para que un RNA fuese considerado útil para los pasos posteriores. Las preparaciones de RNA obtenidas para cada una de las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer de tris-boratos-EDTA (TBE 1 \times , Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Los geles se prepararon pesando 800 mg de agarosa y disolviendo en 100 mL de TBE estéril, la mezcla se calentó por 30 s en un microondas. La agarosa se colocó en un molde y se dejó solidificar a temperatura ambiente por 20-30 min. Se mezclaron 6 μL de la muestra de RNA con 2 μL de buffer de carga azul y 2 μL de una solución de agente intercalante GelRed® 100x. El gel fue montado en una cámara horizontal de electroforesis y se corrió durante una hora con un voltaje de 100 V y una intensidad de corriente de 85 mA. Transcurrido este tiempo, el gel se desmontó de la cámara y se fotodocumentó en un equipo Kodak Edas ® 290 acoplado a un trans-iluminador 3UV de luz ultravioleta a 256 nm. Se determinó la presencia de las dos bandas de las subunidades de rRNA (18s y 26s) en base a su peso molecular medido interpolando con los tamaños de un marcador de peso molecular Hyperladder IV de promega ®.

El tamaño molecular, integridad y concentración de ácidos nucleicos fueron también determinados empleando el Bioanalizador 2100 de Agilent y el kit nanochip para RNA (RNA 6000 Nano Kit Agilent) el cual emite los resultados manera automatizada en un formato digital, en base a geles de electroforesis en nano chips.

El primer paso para el análisis fue la preparación del marcador de RNA (ladder), el cual se desnaturalizó en un bloque térmico durante 2 minutos a 70°C , se realizaron

alícuotas de trabajo y se almacenaron a -70°C . Posteriormente, se armó la estación de preparación del nano chip de RNA, primeramente se reemplazó la jeringa utilizada anteriormente por una nueva y se ajustaron tanto la palanca de la base en la posición adecuada (posición C para el nano chip de RNA) como el clip para sostener la jeringa (posición superior). A continuación se preparó el gel para el nano chip, para lo cual se agregaron $550\ \mu\text{l}$ de “RNA 6000 Nano Gel Matrix” en un filtro, el cual fue centrifugado a $15,000\ \text{g}$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se prepararon alícuotas de $65\ \mu\text{l}$ del gel filtrado en microtubos. Se mezclaron $65\ \mu\text{L}$ de gel RNA 6000 (Agilent technologies) previamente filtrado con $1\ \mu\text{L}$ de mezcla colorante en un tubo de filtración, se homogenizó y luego se centrifugó a $1500\ \text{g}$ por 10 min. Esta mezcla se cargó en el chip en los pocillos correspondientes para cargar el gel. Inmediatamente después de cargó $5\ \mu\text{L}$ del marcador (RNA 6000 nanomarker, Agilent technologies) en los 12 pozos para muestras y en el pocillo para el marcador (ladder), $1\ \mu\text{l}$ del marcador y $1\ \mu\text{l}$ de cada una de las muestras a analizar, depositando la muestra en el pocillo correspondiente. Posteriormente el chip se llevó a vortex durante 1 minuto a $2400\ \text{rpm}$, se colocó en el equipo y se corrió el programa 2100 Expert de Agilent durante 30 min. Al final el equipo arrojó un electroferograma de señal de fluorescencia contra tiempo de corrida, las concentraciones de RNA y el número de integridad de RNA (RIN) para cada una de las muestras de todos los cultivos realizados de las dos condiciones (Felix Castro, 2013).

5.4.6 Transcripción inversa

Las preparaciones de RNA total aisladas se trataron con la enzima DNAsa RQ1(Promega), libre de RNAsa, para eliminar la posible contaminación con DNAg, que en pasos subsecuentes pudiera generar falsos positivos. En un ambiente limpio y libre de nucleasas, empleando material nuevo y libre de RNAsas, primeramente, se preparó la mezcla de reacción con los componentes que aparecen en la Tabla IX. A continuación, las muestras se incubaron en un termociclador durante 1 h a 37°C , enseguida a cada muestra se le agregó $2\ \mu\text{L}$ de la solución “Stop” DNAsa RQ1 Promega y se incubaron en un termociclador a 65°C durante 10 min para inactivar la enzima DNAsa. Finalmente,

las muestras se usaron inmediatamente en la reacción de transcripción inversa. Las muestras tratadas fueron etiquetadas de acuerdo a la nomenclatura establecida (Ver anexo 1) y almacenadas en hielo para su inmediato uso en la síntesis de DNAc. Se realizaron tratamientos con DNasa a todas las muestras de RNA obtenidas de los dos cultivos a analizar, trabajando una muestra por día, seguido de la síntesis de DNAc y los ensayos de qPCR.

Tabla IX

Mezcla de reacción para el tratamiento del RNA total con la DNasa RQ1.

Reactivo	Volumen (μL)
Solución de RNA	24
Buffer de DNasa RQ1 Promega (10X)	3
DNasa RQ1 Promega (1 U/ μL)	3
Volumen final	30

Para la síntesis del DNAc se utilizó el RNA aislado en el punto 5.4.5 y el kit de Agilent AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis®, siguiendo el protocolo para la síntesis de DNAc de una hebra, trabajando en un ambiente limpio y libre de nucleasas, empleando material nuevo y libre de RNasas. A partir de las muestras de RNA tratadas con DNasa, se realizaron ensayos de retrotranscripción por triplicado para cada una de las muestras, para lo cual se preparó una mezcla inicial agregando en orden para una preparación: 150 ng totales de RNA, 1 μL de oligo(dT) (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y agua libre de RNasas, necesaria para obtener un volumen final de 15.7 μL (Tabla X). Esta mezcla se calentó en un termociclador a 65°C por 5 min para después dejar enfriar 10 min a temperatura ambiente (Tabla XI). Paralelamente se realizó una segunda mezcla agregando en orden para una preparación: 2.0 μL de buffer de reacción, 0.8 μL de mix de dNTP's (25 mM) y 0.5 μL de inhibidor de ribonucleasas (40 U/ μL). Esta mezcla se agregó con la primera y por último, se añadió 1 μL de enzima transcriptasa reversa AffinityScript Multiple Temperature. Los tubos se incubaron en un termociclador

durante 1 hora a 42°C y durante 15 minutos a 70°C (Tabla XI). Por cada ensayo de síntesis de DNAc se realizó a la par un ensayo como control negativo de la retrotranscripción siguiendo los pasos descritos previamente, evitando añadir los volúmenes de enzima transcriptasa reversa.

Tabla X

Mezcla de reacción para transcripción inversa	
Reactivo	Volumen (µl)
Solución de RNA	Variable (150 ng totales)
Oligo dT	1.0
Agua libre de RNasas	Ajustar a 20 µl
Buffer	2.0
dNTP's	0.8
RNase Block	0.5
Enzima Affinity Script	1.0
Volumen final	20

Tabla XI

Condiciones del ensayo de síntesis de DNAc.

Ciclos	Duración del ciclo	Temperatura
1	5 minutos	65°C
1	10 minutos	24°C
1	1 hora	42°C
1	15 minutos	70°C

5.4.7 qPCR

Los DNAc generados para cada muestra en el punto anterior se amplificaron por duplicado con los oligonucleótidos específicos diseñados y empleando el Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) para los transcritos de los genes *AOX2*, *PEP4*, *PRB1*, *PRC1*, *KEX2*, *KAR2*, *G6PD*, y *YPT1*, o bien el Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix para los transcritos de los genes *FTEII* y *GAP*.

Se siguió el protocolo del manual de la compañía, trabajando en un ambiente limpio y libre de nucleasas, empleando material nuevo. Las sondas diseñadas fueron elaboradas por IDT technologies utilizando el fluorógeno 5' FAM y el extintor (quencher) ZEN/3' Iowa Black FQ. Las reacciones de qPCR se realizaron en un equipo Mx3005P QPCR System de Agilent Technologies.

Todos los oligonucleótidos usados se resumen en la tabla XII. Éstos fueron resuspendidos en 1 mL de agua ultrapura y se agitaron toda la noche. Después de se prepararon alícuotas de trabajo de 100 μ L y se guardaron a -20°C . Las sondas hidrólisis se resuspendieron en 400 μ L de una solución amortiguadora (10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 8.0) y se mezclaron toda la noche, después se formaron alícuotas de 100 μ L y se almacenaron a -20°C .

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 20 μ L utilizando la mezcla de reacción que se muestra en las tablas XIII y XIV. El DNAc y el control negativo de la síntesis de DNAc (sin enzima retrotranscriptasa) se diluyeron 1:25 (la dilución se realizó con agua MilliQ libre de nucleasas). También se realizaron mezclas de qPCR sin DNAc, como control negativo del ensayo de qPCR. Los diferentes DNAc empleados fueron etiquetados para su identificación: símbolo (+) para las muestras con DNAc (reacción positiva de retrotranscripción) y símbolo RT (-) para las muestras del sin retrotranscriptasa (reacción negativa de la retrotranscripción) y PCR (-) para el control negativo del ensayo de qPCR.

Tabla XII

Secuencias de oligonucleótidos y sondas utilizados en las qPCRs.

Oligonucleótido	Gen	Secuencia	Tm (°C)
5qKEX2	<i>KEX2</i>	GCCACTTTTTTCGTCTTCCTCT	60
3qKEX2	<i>KEX2</i>	GAAGTCTCTTTTACATCCGTTTCC	60
5qAOX2	<i>AOX2</i>	ACGGGCTTTTAACTACATTGTTCT	60
3qAOX2	<i>AOX2</i>	TGTAGTCAATACAGTTGATCCGAAA	60
5qPEP4	<i>PEP4</i>	GATCCGAATATGCTGAATTGC	60
3qPEP4	<i>PEP4</i>	GGCAAAGCAATCAATGAGGT	60
5qPRC1	<i>PRC1</i>	CGCTCAGATGGGACCCTA	60
3qPRC1	<i>PRC1</i>	GGATCCACCATCACATTCT	60
5qPRB1	<i>PRB1</i>	TTAAGGGCTCTACCGCTAACA	60
5qPRB1	<i>PRB1</i>	CATTGACTGCAAGGTCCAAA	60
5qKAR2	<i>KAR2</i>	GTCCATCACCATCAACAATGA	60
3qKAR2	<i>KAR2</i>	CTCGGCCTCTTCAACCATAC	60
5qFTEII	<i>FTEII</i>	TCCAAATCACTGACGGTCCAGA	60
3qFTEII	<i>FTEII</i>	TCACCGTCTTGAGCAACGAACA	60
5qYPT1	<i>YPT1</i>	GCGGTCAAGCTAGTGCTTCT	60
3qYPT2	<i>YPT2</i>	TGCTGACAAAACGTAAAACCA	60
5qG6PD	<i>G6PD</i>	TTAAGCCAGGTTCTAAATGTGTCA	60
3qG6PD	<i>G6PD</i>	TTCCACCTTTCTGTGTTGA	60
Sonda de hidrólisis	Gen	Secuencia	Tm (°C)
pFTE	<i>FTEII</i>	TTTGGGTTTTCGGTTTGGGTCCAGA	72

El primer paso para el ensayo de qPCR consistió en realizar una mezcla de reacción agregando en orden para una preparación los siguientes reactivos: 10 µl de Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green, 2 µl de solución de DNAc dilución 1:25 (+), 2 µl de oligonucleótido 5', 2 µl de oligonucleótido 3' y 4 µl de agua libre de nucleasas (Tabla XIII). Para analizar un total de 10 genes por duplicado, se realizó una mezcla de trabajo evitando agregar los oligonucleótidos (Tabla XIV). La mezcla se realizó en un tubo de 0.5 ml, se distribuyó el volumen en tiras de tubos ópticos especiales de 8X y se agregaron 4 µl de una mezcla del par de oligonucleótidos de cada gen a analizar al tubo correspondiente (se utilizó una mezcla de trabajo con los oligonucleótido 5' y 3' a una concentración de 3 µM cada uno). Por último, los tubos fueron cerrados con tiras de tapas ópticas especiales de 8X.

Tabla XIII

Mezcla de reacción de la qPCR con SYBR Green.

Reactivo	Volumen 1X (µl)
Brilliant III qPCR Master mix SYBR Green ®	10
Agua libre de nucleasas	4
Oligonucleótido 5'	2
Oligonucleótido 3'	2
cDNA 1:25 (+)	2
Total	20

Tabla XIV

Mezcla de trabajo para 20 ensayo de qPCR con SYBR Green.

Reactivo	Volumen 20X (µl)
Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green	200
Solución de DNAc 1:25 (+)	40
Agua libre de nucleasas	80
Volumen final	320

Posteriormente se realizó una segunda mezcla de reacción para analizar las muestras de control negativo de la retrotranscripción, en la cual se agregaron en orden para una preparación los mismos reactivos que para el análisis de las muestras de DNAc (+) pero en la mitad del volumen: 5 µl de Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green, 1 µl de solución de DNAc dilución 1:25 (-), 1 µl de oligonucleótido 5', 1 µl de oligonucleótido 3' y 2 µl de agua libre de nucleasas. De la misma manera se realizó una mezcla de trabajo en un volumen suficiente para analizar un total de 10 genes, evitando agregar los oligonucleótidos y procediendo con el protocolo antes descrito. A continuación, se realizó una tercera mezcla de reacción para un ensayo que funcionara como control negativo de la qPCR sin DNAc, para el cual se agregaron en orden para una preparación los siguientes reactivos: 5 µl de Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green, 1 µl de oligonucleótido 5', 1 µl de oligonucleótido 3' y 3 µl de agua libre de nucleasas. De la misma manera como se describió previamente, se realizó una mezcla de trabajo en un volumen suficiente para analizar un total de 10 genes, evitando agregar los oligonucleótidos. Todos los tubos con las mezclas realizadas fueron centrifugados en una minicentrífuga durante 10 segundos y colocados en la placa del equipo Mx3005P QPCR System de Agilent Technologies en el cual se eligió el programa SYBR® Green (with Dissociation Curve). Las condiciones para cada ciclo de PCR fueron ajustadas como se muestra en la tabla XV.

Por último se determinaron y analizaron los valores de C_T obtenidos para cada una de las reacciones de amplificación con los oligonucleótidos empleados para cada una de las muestras de DNAc ajustando el umbral de cuantificación a 2000. El DNAc de cada muestra se amplificó por triplicado y se determinó el valor de C_T , estimando media, desviación estándar y coeficiente de variación. Este proceso se realizó para cada uno de los genes evaluados y posteriormente se compararon los coeficientes de variación de todos los C_T estimados con el fin de determinar las características de la muestra que dio la menor variación. Además, para validar empíricamente la especificidad de los oligonucleótidos, se analizaron las curvas de disociación generadas para cada uno de los oligonucleótidos sintetizados, para observar la formación de bandas inespecíficas.

Tabla XV

Condiciones del ensayo de qPCR empleando SYBR Green.

Ciclos	Duración del ciclo	Temperatura
1	3 minutos	95°C
40	20 segundos	95°C
	20 segundos	60°C ^a
	1 minuto	95°C
1	30 segundos	55°C ^b
	30 segundos	95°C

a: lectura de fluorescencia al final de la etapa.

b: lectura de fluorescencia durante el aumento de la temperatura de 55 a 95°C.

Debido a la presencia de bandas inespecíficas en las curvas de disociación en los ensayos de qPCR realizados con los oligonucleótidos para los genes de *GAP* y *FTEII*, se realizó un ensayo de qPCR empleando las muestras de DNAc a diferentes temperaturas de hibridación a la empleada originalmente (Tabla XVI). Se analizaron las curvas de disociación de cada ensayo de qPCR con cada oligonucleótido para evaluar la especificidad de los oligonucleótidos sintetizados.

Sin embargo por la persistencia de la presencia de bandas inespecíficas en los ensayos de qPCR empleando los oligonucleótidos para amplificar las secuencias de *GAP* y *FTEII* con SYBR green como agente fluorogénico se realizó el diseño de nuevos pares de oligonucleótidos específicos siguiendo el procedimiento 5.4.3.

Tabla XVI

Ensayo de PCR para la optimización de oligonucleótidos.

Ciclos	Duración del ciclo	Temperatura 2
1	3 minutos	95°C
40	20 segundos	95°C
	20 segundos	65°C ^a
	1 minuto	95°C
1	30 segundos	55°C ^b
	30 segundos	95°C

a: lectura de fluorescencia al final de la etapa.

b: lectura de fluorescencia durante el aumento de la temperatura de 55 a 95°C.

Para realizar los ensayos de qPCR de los genes *FTEII* y *GAP* a partir de las preparaciones de DNAc recién sintetizado, se empleó el Master Mix de Agilent Technologies Brilliant III Ultra-Fast QPCR & QRT-PCR. La mezcla de reacción consistió en agregar en orden para una preparación los siguientes reactivos: 10 µl de Brilliant III Ultra Fast, 2 µl de solución de DNAc dilución 1:25 (+), 4 µl de kit PrimeTime Mini y 4 µl de agua libre de nucleasas (Tabla XVII). Se realizó una mezcla de trabajo en un volumen suficiente para analizar un total de 2 genes por duplicado, evitando agregar los oligonucleótidos (Tabla XVIII). La mezcla fue realizada en un tubo de 0.5 ml, se distribuyó el volumen en tiras de tubos ópticos especiales de 8X y se agregaron 4 µl del kit PrimeTime Mini el cual contiene el par de oligonucleótidos y la sonda de hidrólisis (Sonda de hidrólisis 1.25 µM, Oligonucleótido 5' 2.5 µM y oligonucleótido 3' 2.5 µM). Por último los tubos fueron cerrados con tiras de tapas ópticas especiales de 8X.

Tabla XVII

Mezcla de reacción para el ensayo de qPCR empleando sondas de hidrólisis.

Reactivo	Volumen 1X (µl)
Brilliant III Ultra-Fast	10.0
Solución de DNAc 1:25 (+)	2.0
Kit PrimeTime Mini*	4.0
Agua libre de nucleasas	4.0
Volumen final	20

*Contiene sonda de hidrólisis y oligonucleótidos 3 y 5'

Tabla XVIII

Mezcla de trabajo para analizar las muestras de DNAc en los ensayos de qPCR empleando sondas de hidrólisis.

Reactivo	Volumen 4X (µl)
Brilliant III Ultra-Fast	40.0
Solución de DNAc 1:25 (+)	8.0
Agua libre de nucleasas	16.0
Volumen final	64.0

Se realizaron mezclas de reacción para el control negativo de la retrotranscripción y para el control negativo de la qPCR sin DNAc, siguiendo el mismo protocolo descrito para las reacciones llevadas a cabo con SYBR Green.

Todos los tubos fueron centrifugados en una minicentrífuga 10 segundos y colocados en la placa del equipo Mx3005P QPCR System de Agilent Technologies en el cual se eligió el programa Comparative Quantitation. Las condiciones para cada ciclo de PCR fueron ajustadas de acuerdo a la tabla XIX. Los valores obtenidos de C_T fueron empleados para determinar posteriormente los niveles de expresión relativa. Nuevamente, para los casos de que la dilución del DNAc no fuera la adecuada para

obtener valores de C_T dentro del intervalo de linealidad, el ensayo se realizó empleando la dilución adecuada (Fig. 25).

Tabla XIX

Condiciones del ensayo de qPCR empleando sondas de hidrólisis.

Ciclos	Duración del ciclo	Temperatura
1	3 minutos	95°C
40	20 segundos	95°C
	20 segundos	60°C ^a

a: lectura de fluorescencia al final de la etapa.

5.4.8 Linealidad y eficiencia de la reacción de la qPCR

Para determinar la eficiencia de amplificación (E) de cada transcrito se realizaron ensayos de qPCR de cinco diluciones seriadas (5, 25, 125, 625 y 3125), cada una por duplicado a partir del DNAc preparado a partir de 150 ng de RNA total con cantidades que oscilaron en un intervalo 0.1 – 56.6 ng totales.

Las diluciones se realizaron a partir de muestras de DNAc provenientes de células del cultivo de mayor producción de fitasa extracelular al el tiempo de 68 horas después de la inducción con metanol (Muestra CM1-M4). Los ensayos de qPCR se realizaron siguiendo los lineamientos establecidos previamente y empleando los oligonucleótidos diseñados para los mismos. Se realizaron mezclas de trabajo en un volumen suficiente para 5 reacciones por duplicado (5 muestras de DNAc), evitando agregar el DNAc, se distribuyó el volumen en tiras de tubos ópticos especiales de 8X y se agregaron 2 μ l de cada muestra de DNAc al tubo correspondiente (Felix Castro, 2013).

Para cada dilución se estimó el valor de C_T , empleando una fluorescencia umbral de 2000 a partir de las curvas de amplificación. Con el log los valores de C_T de cada dilución y los valores teóricos de la cantidad de RNA se construye una recta y a partir de la pendiente de esta recta se calculó el valor de la eficiencia de la qPCR. Se consideraron los intervalos lineales de las curvas, considerando un r^2 lo más cercana a un

valor de uno, estos intervalos limitantes fueron considerados para los valores de C_T que delimitan la curva de dilución. La eficiencia de amplificación (E) se determinó de la pendiente de la curva en el intervalo lineal, considerando el criterio de un valor superior al 90% y menor del 110%. Los valores de todos estos parámetros (r^2 , E, y valores de C_T que delimitan la curva de dilución) fueron estimados de forma automática por el programa que se opera con el equipo de qPCR (MxPro[®] - Mx3005P[®] v4). Por último los valores fueron registrados en una plantilla de trabajo de Microsoft Excel en la cual, posteriormente, se realizaron los cálculos de expresión relativa.

5.4.9 Análisis de los niveles de expresión de los genes en estudio a dos condiciones de cultivo

Para el análisis de los niveles de expresión de los genes en estudio y normalizadores (*KEX2*, *AOX2*, *PEP4*, *PRC1*, *PRB1*, *YPT1*, *KAR2*, *G6PD*, *GAP* y *FTEII*), mediante la determinación y comparación de los valores de C_T obtenidos en los ensayos de qPCR realizados a partir de muestras a diferentes tiempos de inducción de los cultivos de optimización (diseño experimental Simplex, sección 5.3.3) se consideraron para este estudio los cultivos de menor y mayor producción de fitasa FTEII extracelular (cultivos J y C) se siguieron las siguientes etapas previamente descritas: primeramente el muestreo y conservación de muestras de cultivo en tiempos representativos después de la inducción con metanol, para lo cual se realizaron cultivos por triplicado de cada condición y se analizaron 5 tiempos de inducción (Fig. 22) de cada uno de los cultivos realizados (0, 22, 30, 47 y 68 h); la extracción de RNA total de todas las muestras conservadas; la síntesis de DNAc de las muestras de RNA total obtenidas; los ensayos de qPCR empleando los 8 pares de oligonucleótidos diseñados para emplearse con agentes intercalantes para las secuencias de: *KEX2*, *AOX2*, *PEP4*, *PRC1*, *PRB1*, *YPT1*, *KAR2*, *G6PD* y dos pares de oligonucleótidos diseñados para ser empleados con sondas de hidrólisis para las secuencias de *GAP* y *FTEII* a partir de la muestra de DNAc recién sintetizada; y el análisis de los niveles de expresión relativa a partir valores de C_T obtenidos, considerando que el coeficiente de variación de los valores de C_T fuera menor al 5%, de lo contrario se realizó nuevamente el ensayo de

qPCR. Si la reproducibilidad fue adecuada, se promediaron los valores de C_T obtenidos y se verificó que el valor promedio de C_T se encontrara dentro de la curva de eficiencia determinada, de lo contrario se realizó nuevamente el ensayo de qPCR empleado otra dilución de DNAc. Por último si el valor de C_T se encontró dentro de la curva de eficiencia se calculó el nivel de expresión relativa empleando el valor promedio de C_T (Fig. 25).

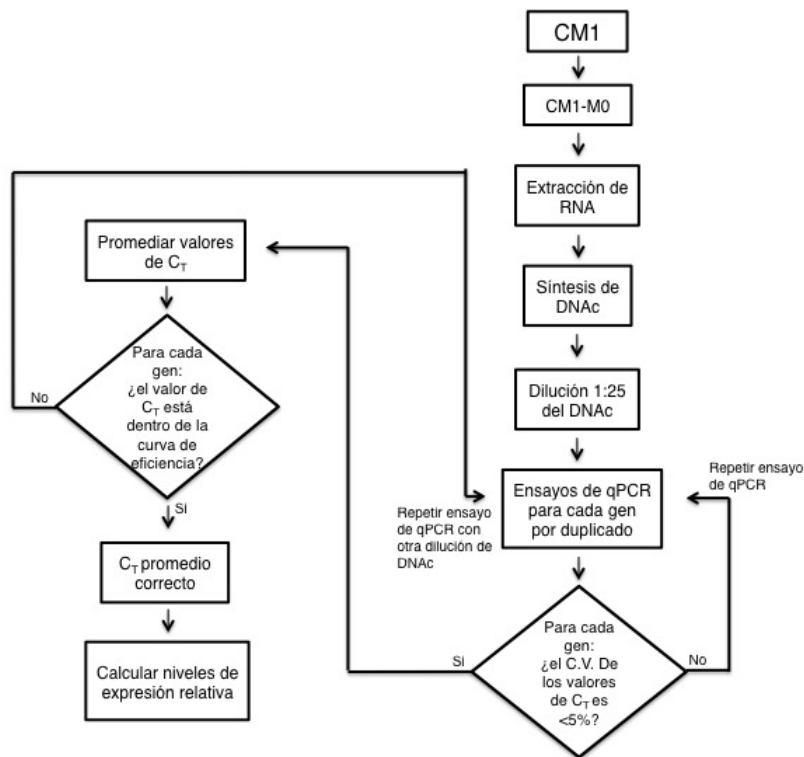


Figura 25. Diagrama de flujo con la estrategia para el análisis de los niveles de expresión relativa ejemplificando la muestra CM1-M0. Todas las muestras se analizaron empleando la misma estrategia (Felix Castro, 2013).

Se realizaron ensayos de qPCR simultáneamente para todos los genes en una muestra de DNAc proveniente de un tiempo de inducción de un cultivo realizado a unas condiciones determinadas. Se emplearon los Master Mixes de Agilent Technologies, Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR & QRT-PCR para 8 de los genes en estudio y normalizadores (*KEX2*, *AOX2*, *PEP4*, *PRC1*, *PRB1*, *YPT1*, *KAR2*, *G6PD*) y Brilliant III Ultra-Fast QPCR & QRT-PCR para los dos genes restantes (*GAP* y *FTEII*). Primeramente se realizaron los ensayos de qPCR con SYBR Green e inmediatamente

después se realizaron los ensayos de qPCR con sondas de hidrólisis. Todos los ensayos de qPCR se realizaron por duplicado empleando una dilución inicial 1:25 de la muestra de DNAC para todos los genes a evaluar. El umbral de fluorescencia fue ajustado a 2000 en todos los ensayos, en todos los caso pertinentes, se ajustó la dilución del DNAC para obtener valores de C_T dentro del intervalo de linealidad, los valores obtenidos de C_T fueron registrados en una plantilla de trabajo de Excel.

5.4.9.1 Determinación de los genes normalizadores en el cálculo de la expresión relativa

Ya que inicialmente se contó con tres genes normalizadores (*YPT1*, *G6PD* y *GAP*), siete genes de estudio, muestras de cinco tiempos de cultivo y condiciones de cultivo, se decidió evaluar el gen normalizador o combinación de estos que fueran los más adecuados para estimar la expresión relativa. Esta evaluación se realizó en función del coeficiente de variación conjunta estimada a partir de los valores de expresión relativa a 4 tiempos determinados. Para la expresión relativa se consideraron los valores de cada uno de los tres replicados del cultivo CM, en un tiempo dado y de cada uno de los siete genes evaluados (3 cultivos, un tiempo y siete genes). En base a estas consideraciones se determinó la estabilidad de los tres genes normalizadores (*YPT1*, *G6PD* y *GAP*), considerando la mejor opción aquella que mostrara la menor variación conjunta de los resultados en los niveles de expresión relativa de todos los genes analizados. Para realizar esta evaluación se realizaron los cálculos de expresión relativa empleando los niveles de expresión de un sólo gen normalizador (*YPT1*, *G6PD* ó *GAP*), o bien, la media geométrica de los niveles de expresión de dos genes normalizadores o la media geométrica de los niveles de expresión de tres genes normalizadores (Tabla XX). Los cálculos se realizaron para los tres cultivos realizados de la primera condición (CM) en todos los tiempos de inducción con metanol (22, 30, 47 y 68 h). Para cada uno de los siete genes y en cada tiempo de inducción se determinó la media de los niveles de expresión relativa y se determinó su coeficiente de variación empleando cada una de las combinaciones de los genes normalizadores. Por último, se calculó el promedio de los coeficientes de variación obtenidos con cada combinación de genes normalizadores para cada caso y se compararon entre sí (Felix Castro, 2013).

Tabla XX

Diferentes combinaciones de genes normalizadores para su evaluación en el cálculo de la expresión relativa (Felix Castro, 2013).

1 gen normalizador	2 genes normalizadores	3 genes normalizadores
YPT1	YPT1 + G6PD	YPT1 + G6PD + GAP
G6PD	YPT1 + GAP	
GAP	G6PD + GAP	

5.4.9.2 Cálculo de los niveles de expresión relativa

Para determinar los niveles de expresión relativa se determinó la eficiencia (E), linealidad (r^2) e intervalos de linealidad de los ensayos de qPCR para cada uno de los genes en estudio, se realizó un análisis de los genes de referencia a emplearse como normalizadores para determinar la combinación óptima de los genes normalizadores que permitiera obtener la menor variación global en los niveles de expresión y por último se empleó la ecuación 17 (se desglosa en el anexo II) para el cálculo de los niveles de expresión relativa en base al método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. La ecuación 17 (Anexo II), la cual fue aplicada en una plantilla de Excel, la cual empleó como información de entrada los valores de C_T por duplicado para cada uno de los genes en estudio y genes normalizadores correspondientes a cada uno de los tiempos de cultivo analizados y a las tres repeticiones de cada condición de cultivo. De los valores de C_T se calculó su media y coeficiente de variación, se incluyó también la dilución del DNAC empleada en cada ensayo de qPCR (generalmente 25), en la plantilla de Excel se incluyó también los valores de eficiencia, intervalos de linealidad y linealidad, los primeros dos valores son necesarios para la determinación de los niveles de expresión relativa de acuerdo a la ecuación 17, mientras que el tercero permitió evaluar que los valores de C_T obtenidos para cada gen en estudio se encontraran dentro de los intervalos de linealidad previamente estimados. La ecuación se alimentó con los valores promedios de duplicados de C_T de cada uno de los genes en estudio y de los genes normalizadores para

cada uno de los tiempos de cultivo analizados y las repeticiones de cada condición de cultivo evaluadas. Para el cálculo de la expresión relativa se emplearon como genes normalizadores los genes *YPT1* y *G6PD* y como muestras calibradoras las muestras de los tiempos de inducción de 0 h.

5.4.9.3 Comparación de los niveles de expresión relativa de los genes en estudio

Se realizaron tres análisis estadísticos para comparar los niveles de expresión relativa de los genes en estudio en tres casos: comparación de los niveles de expresión relativa a lo largo del cultivo comparando la expresión relativa de cada tiempo con el inicio de la etapa de inducción con metanol o tiempo cero; comparación de los niveles de expresión relativa entre dos diferentes tiempos a lo largo del cultivo en la etapa de inducción con metanol; y por último una comparación a un momento puntual del cultivo de la expresión relativa en las dos condiciones de cultivo durante la etapa de inducción con metanol. Para comparar los niveles de expresión de los genes en estudio a los diferentes tiempos de inducción analizados tomando como referencia el inicio de la etapa de inducción, se realizaron análisis estadísticos de comparación de medias mediante una prueba t de Student para una muestra, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ (IBM SPSS 21.0.0.0.0). Se analizó la media de los valores de expresión relativa de cada tiempo de inducción (22, 30, 47 y 68 h) contra un valor fijo igual a 1 que corresponde al inicio de la etapa de inducción y que es a su vez la muestra calibradora. Para comparar los niveles de expresión de los genes en estudio a lo largo del cultivo en la etapa de inducción con metanol, se realizaron análisis estadísticos de comparación de medias mediante una prueba t de Student para muestras relacionadas con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ (IBM SPSS 21.0.0.0.0). Se analizó la media de los valores de expresión relativa de cada tiempo contiguo de inducción con metanol (22 h comparado con 30 h, 30 h comparado con 47 h y 47 h comparado con 68 h). Los análisis se realizaron para las dos condiciones de cultivo evaluadas.

Para evaluar el efecto las dos condiciones de cultivo en los niveles de expresión de genes en estudio, se realizaron análisis estadísticos de comparación de medias mediante una prueba t de Student para muestras independientes con un nivel de

significancia de $\alpha=0.05$ (IBM SPSS 21.0.0.0.0). Se analizó la media de los valores de expresión relativa de cada tiempo de inducción (22, 30, 47 y 68 h) de las dos condiciones de cultivo evaluadas.

5.5 Correlación de la expresión de genes con la respuesta fisiológica del hospedero

Con los datos de los niveles de expresión de los cultivos de mayor y menor producción de fitasa extracelular se generaron graficas para cada gen en las dos condiciones a lo largo del tiempo de inducción, utilizando el programa Microsoft Excel 2007. Los niveles de expresión del gen *FTEII* se correlacionaron con la producción de fitasa *FTEII*, el porcentaje de secreción y la producción total de fitasa. Los niveles de expresión de las proteasas *PEP4*, *PRC1* y *PRB1* se correlacionaron con la actividad de proteasas extracelulares y la producción de fitasa extracelular. Los niveles de expresión del gen *AOX2* se correlacionaron con el crecimiento celular, consumo de metanol y producción de fitasa extracelular. Por último, los niveles de expresión de los genes *KEX2* y *KAR2* se correlacionaron con la producción de fitasa extracelular. Todos estos parámetros fisiológicos mencionados se determinaron en cada tiempo bajo los mismos métodos descritos previamente en la sección 5.3.

6 RESULTADOS

6.1 Optimización de factores ambientales que definen las condiciones de cultivo para incrementar la producción de una fitasa extracelular en *Pichia pastoris*

6.1.1 Definición de la combinación de variables para las condiciones de cultivo.

Se realizó un estudio teórico de agrupación estadístico de pares sin ponderación y con medias aritméticas. Se utilizaron referencias bibliográficas de cultivos en fermentador con *P. pastoris* que cumplieran las siguientes características: 1) fenotipo de utilización de metanol Mut^s, 2) sistema de expresión controlado por el promotor de *AOX1* y 3) el cultivo fue hecho en biorreactor. En la Fig. 26 se muestra el análisis de agrupamiento cluster. De los 45 experimentos analizados en los artículos científicos, solo 22 cumplieron las características para agruparse en el análisis. Los experimentos extraídos de las referencias se agruparon en base los valores de las siguientes condiciones de cultivo: temperatura (°C), pH, densidad celular al inicio de la etapa de inducción con metanol (g/L peso seco). Después de obtener los grupos, se calculó la productividad volumétrica promedio de cada grupo en base las productividades volumétricas (gL⁻¹h⁻¹) de cada elemento dentro del grupo. El grupo A y el grupo D correspondieron a los grupos de mayor productividad y el C y B a los de menor productividad. Posteriormente se extrajo la información de las condiciones de cultivo promedio de cada grupo: (Temperatura (°C), pH, densidad celular (g/L peso seco), concentración de metanol (g/L), presencia de sorbitol como fuente de carbono adicional y se determinó si el valor correspondía a un índice alto o bajo en base a la media total de los 22 experimentos.

Con este estudio se determinó que el grupo correspondiente a la mayor productividad volumétrica fue el grupo A cuyas condiciones de cultivo fueron 27°C, 176 g/L de peso húmedo, pH 5, concentración de metanol de 1.5 g/L y ausencia de fuente de

carbono al inicio de la inducción. Para los grupos de menor productividad (grupos B y C) se mostró una temperatura de 29°C, pH 5, concentración de metanol de 1 g/L, biomasa inicial de 200 g/L de peso húmedo.

En resumen, de este estudio de agrupamiento se puede concluir que las temperaturas por debajo de 29°C influyen en una mayor producción, el pH no mostró una influencia significativa y una mayor densidad celular al inicio de la inducción no resultaría en una mayor productividad, a su vez, la concentración de metanol por arriba de 1 g/L parece influir en mayor productividad y la presencia de una fuente de carbono no parece tener una influencia en la producción.

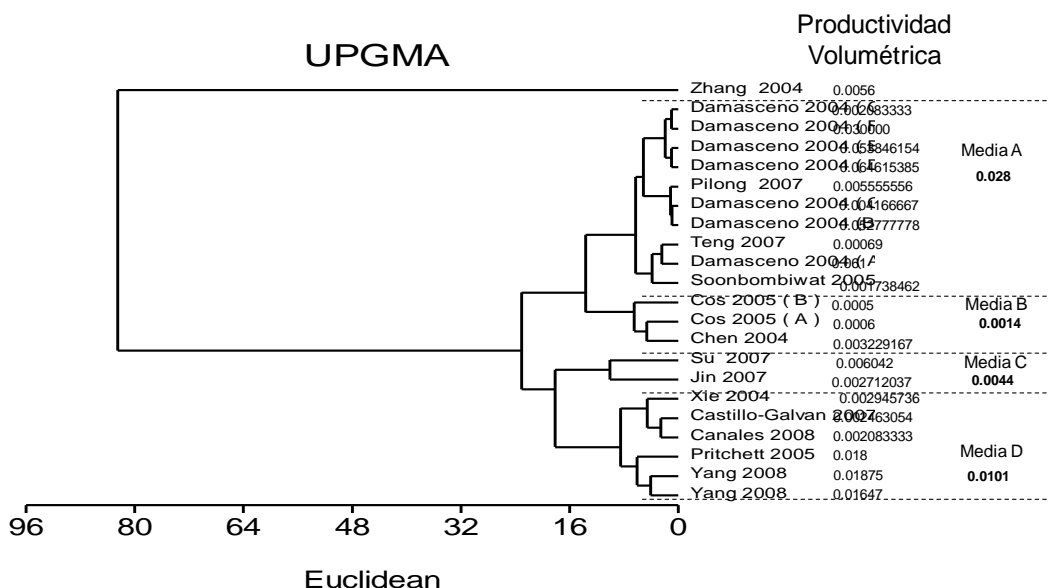


Figura 26. Agrupamiento de pares sin ponderación y con medias aritméticas de los experimentos revisados en la literatura.

6.1.2. Diseño y proceso de optimización empleando el método multifactorial Simplex Secuencial

El proceso de optimación se realizó en cuatro etapas secuenciales realizando un total de diez cultivos. Los cultivos B al H constituyeron la primera etapa, en los que se establecieron las condiciones de cultivo según un diseño factorial simplificado con dos niveles para cada factor a optimizar (Tabla XXI), en este bloque

inicial se obtuvo una producción de fitasa extracelular máxima de 177,944 U totales a las 68 h de inducción (Tabla XXI) en el cultivo H. Las condiciones de cultivo para el segundo bloque, correspondiente al cultivo I (tabla XXI), obtenidas con la ecuación de reflexión del método de optimización Simplex condujeron a una actividad de fitasa extracelular de 230,621 U totales a las 68 h de inducción, 1.29 veces mayor que la actividad del cultivo H. Un nuevo cálculo con la ecuación de reflexión arrojó las condiciones de cultivo A (Tabla XXI), en un tercer bloque de optimización, el cual resultó tener la menor producción de fitasa de entre todos los cultivos con 32,106 U totales de fitasa extracelular. Debido a esto, para el último bloque de optimización se utilizó la ecuación de contracción P (ver ecuación 5.2), la cual llevó a las condiciones de cultivo J (Tabla XXI), que posteriormente llevó a la producción máxima del proceso de optimización con valores 347,682 U totales de fitasa extracelular. Utilizando la ecuación de reflexión de nueva cuenta se obtuvieron nuevas condiciones de cultivo (Cultivo “K”, Tabla XXI) pero al ser estas muy parecidas a las de los cultivos de la matriz inicial (excepto por la temperatura) se dio por terminado el método de optimización en el cultivo J.

Las curvas de producción de fitasa extracelular a lo largo del tiempo de inducción mostraron la formación de dos grupos de cultivos, uno de alta y otro de baja producción de fitasa extracelular (Figura 27). El proceso de optimización condujo a usar 1.5 g/L de concentración de metanol, 24°C, pH 6, sin sorbitol en la etapa de inducción, y una densidad celular inicial de 90 g/L de peso seco. Bajo estas condiciones de cultivo, la producción de fitasa extracelular a las 68 h de inducción fue de 347,682 U (82,814 U/L ó 6.4 g/L de medio de cultivo), 11 veces mayor que la del cultivo con la menor producción de fitasa extracelular (Fig. 28).

Tabla XXI

Condiciones de cultivo calculadas para los cultivos de los bloques de optimización y producción total de fitasa a las 68 h de inducción

Bloque	Cultivo	Temperatura (°C)	Densidad celular Inicial (g/L)**	Metanol (g/L)	pH	Sorbitol ^a	Actividad extracelular total (U)	Actividad volumétrica (U/L)	Producción total (g/L)
	B	30	88	1.0	5	0	63,881	22,383	1.7
	C	30	88	0.5	3	0	66,288	25,059	1.9
	D	20	63	0.5	3	1	68,202	22,513	1.7
I	E	30	63	0.5	3	1	69,243	22,766	1.7
	F	20	63	1.0	5	0	82,509	24,717	1.9
	G	20	88	1.0	5	0	171,784	42,389	3.2
	H	20	88	1.0	5	1	177,944	39,800	3.1
II	I	15-18	95	1.5	6	0	230,621	58,487	4.5
III	A	25	90	2.0	7	0	32,106	12,001	0.9
IV	*J	24	90	1.5	6	0	347,682	82,814	6.4
“V”	“K”	13	82.5	1.0	5	0			

*el cálculo del cultivo J se obtuvo con la ecuación de contracción P. ** Peso seco. ^a presencia ó ausencia de sorbitol

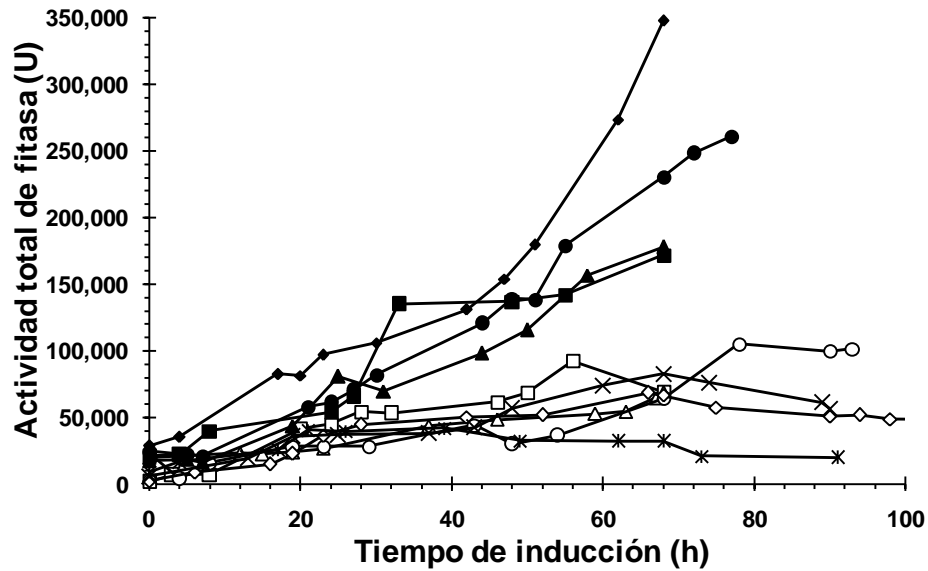


Figura 27. Actividad de fitasa extracelular a lo largo del tiempo de inducción del gen heterólogo para los diez cultivos realizados con la cepa KM71FTEII a diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción. (*): A; (○): B; (◇): C; (△): D; (□): E; (X): F; (■): G; (▲): H; (●): I; (◆): J.

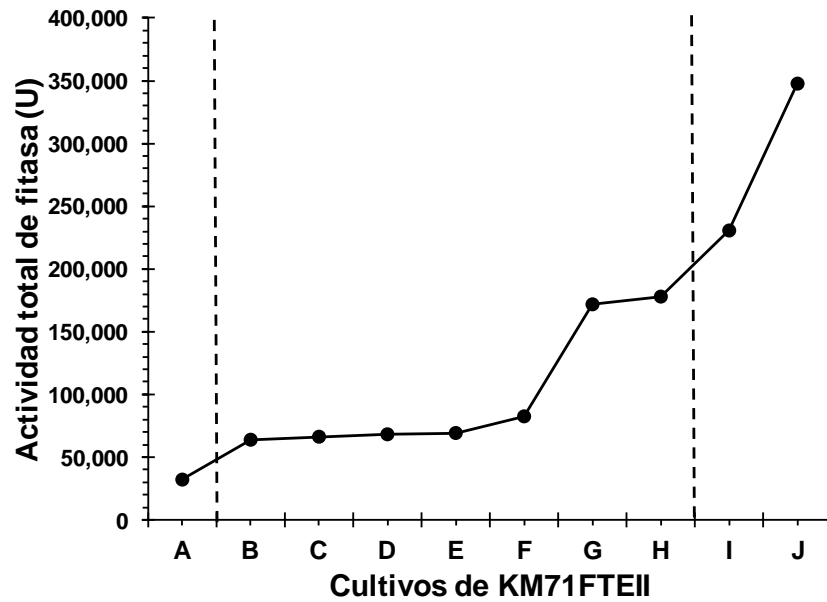
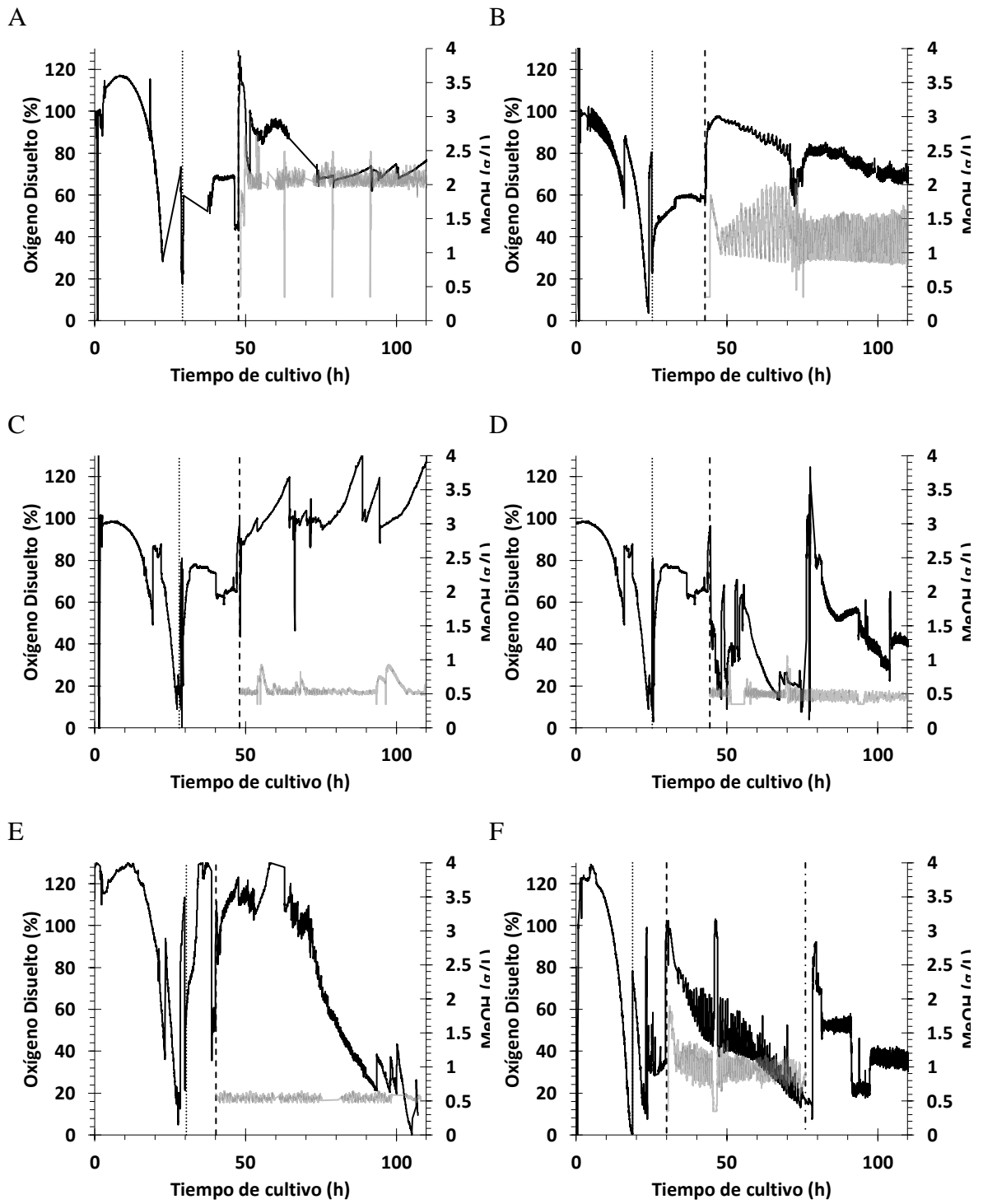


Figura 28. Actividad de fitasa extracelular a las 68 h de inducción en los diez cultivos con la cepa KM71FTEII. Los cultivos están ordenados de menor a mayor producción de fitasa extracelular. Las líneas punteadas encierran el bloque inicial de optimización. Los cultivos A, I y J representan al segundo, tercer y cuarto bloque.

La figura 28 muestra la evolución de la actividad de fitasa extracelular a las 68 h de inducción durante el proceso de optimización en los diez cultivos con la cepa KM71FTEII. Los cultivos están ordenados de menor a mayor producción de fitasa extracelular. Se observaron de nueva cuenta dos grupos, uno de alta producción (cultivos G-J) y otro de baja producción (cultivos A-F).

6.1.3 Oxígeno disuelto y metanol en línea

La Fig. 29 muestra el oxígeno disuelto y el metanol en línea de los cultivos. Existe una correlación de los cultivos de productividad alta (F-J) con el aumento en la demanda de oxígeno disuelto y la posterior adición de oxígeno puro para compensar esta demanda, ya que, para estos cultivos fue necesaria la adición de oxígeno puro aproximadamente a las 48 h de inducción (~80 h de cultivo). Esto no sucedió en los cultivos de menor producción (A- E). El decremento en la concentración de oxígeno disuelto en los cultivos D y E se debió a la adición de sorbitol como fuente de carbono extra al metanol.



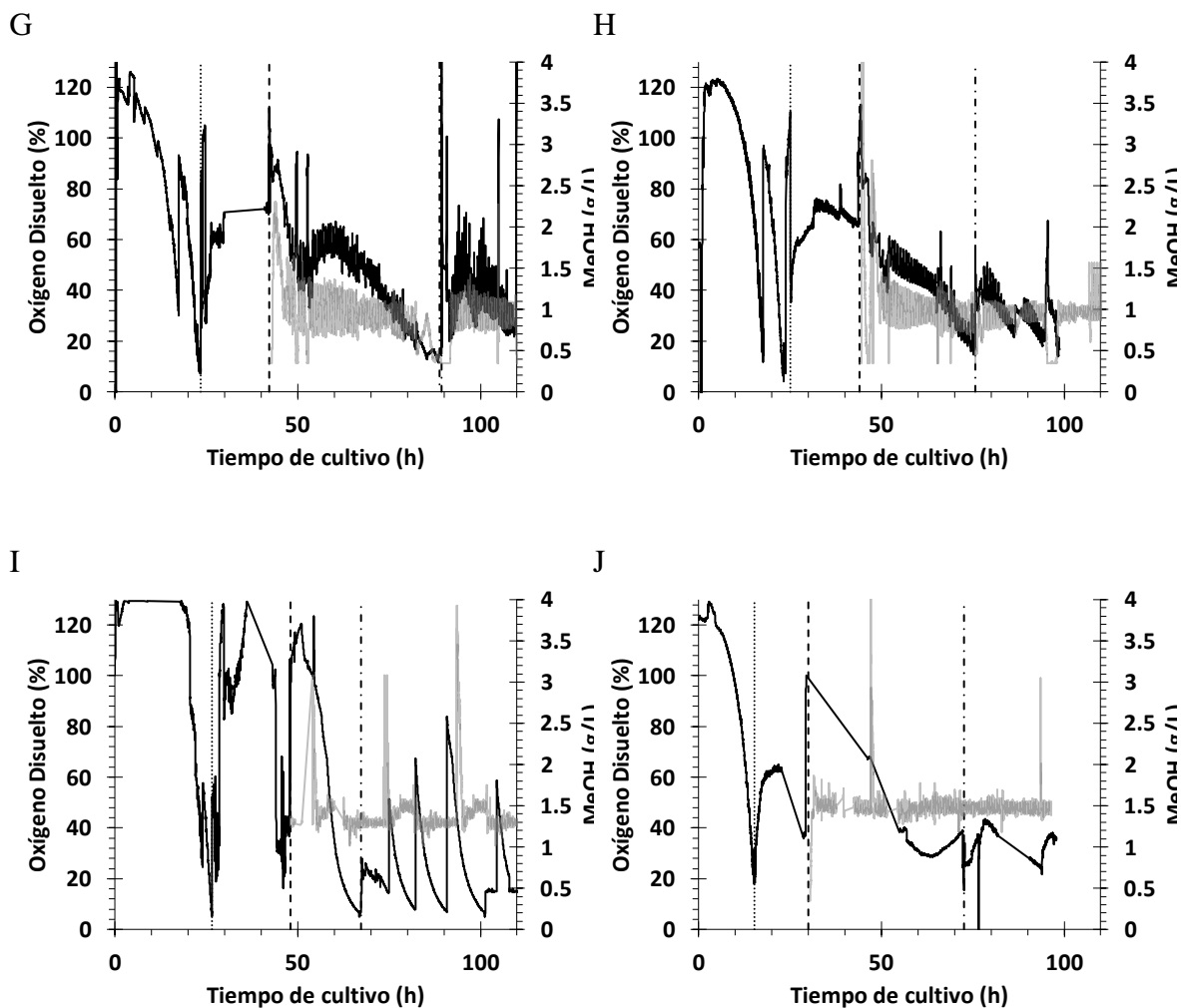


Figura 29. Oxígeno disuelto (negro) y concentración del metanol en línea (gris) para los diez cultivos realizados con la cepa KM71FTEII a diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción. La línea (•••) representa el inicio de la etapa de lote alimentado con glicerol, la línea (- - -) representa el inicio de la inducción con metanol y la línea (- • - • - •) representa el inicio de la alimentación con oxígeno puro (en caso de ser requerido).

6.1.4 Crecimiento celular

Los diez cultivos con la cepa KM71FTEII tuvieron un comportamiento similar en las etapas de crecimiento en glicerol, alcanzando el crecimiento celular deseado entre 62.5-95 g/L de peso seco al final del lote alimentado con glicerol. Durante la etapa de inducción, la densidad celular incrementó de manera exponencial (Figura 30), produciendo a las 68 h de inducción de 6.7 a 462 g totales de peso seco (26.8 a 1848 g de peso húmedo) durante la inducción. Es importante señalar, que el cultivo con la mayor producción de fitasa extracelular (Cultivo J) no fue el cultivo con el mayor crecimiento celular, ya que este, tuvo una biomasa total a las 68 h de inducción de 329.7 g de peso seco (1318 g de peso húmedo). En la tabla XXII se resumen los parámetros de crecimiento celular en los cultivos.

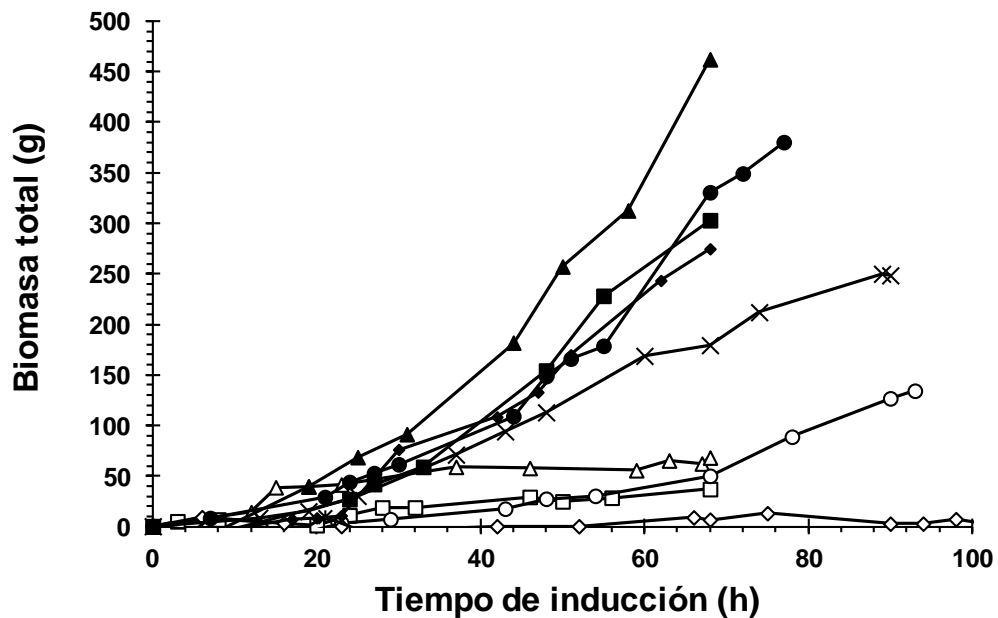


Figura 30. Biomasa total en gramos totales de peso seco a lo largo del tiempo de inducción del gen heterólogo para los diez cultivos realizados con la cepa KM71FTEII a diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción. (*): A; (○): B; (◇): C; (Δ): D; (□): E; (X): F; (■): G; (▲): H; (●): I; (◆): J.

Tabla XXII

Parametros de crecimiento, rendimiento celular y consumo de metanol a las 68 h de inducción.

Cultivo	Densidad celular (g/L)	Biomasa total (g) ^c	μ (h ⁻¹)	Metanol añadido (L)	q _s (mmol/g h)	Y x/s (g/L) ^d
B	98.9 ^a (395.5 ^b)	50.1	0.005	0.25	0.13	118.3
C	349.5 ^a (87.4 ^b)	6.7	-0.0002	0.04	0.11	192.7
D	76.0 ^a (304.1 ^b)	68.2	0.004	0.08	0.15	*-
E	64.6 ^a (258.5 ^b)	37.0	0.0025	0.09	0.56	*-
F	105.9 ^a (423.5 ^b)	179.4	0.013	0.81	0.98	148.6
G	130.1 ^a (520.4 ^b)	303.0	0.017	1.44	1.12	156.9
H	151.0 ^a (604.1 ^b)	462.2	0.013	1.42	1.18	*-
I	139.0 ^a (555.9 ^b)	330.6	0.013	1.29	1.10	234.5
A	75.9 ^a (303.5 ^b)	-47.3	-0.003	0.07	0.12	-486.0
J	121.7 ^a (486.7 ^b)	274.7	0.013	1.55	1.23	176.8

^a peso seco. ^b peso húmedo. ^c gramos de peso seco. *no determinado debido a la presencia de sorbitol como segunda fuente de carbono. ^d gramos de biomasa por litros de metanol.

6.1.5 Consumo de metanol y velocidades de demanda de metanol

Para los diez cultivos con la cepa KM71FTEII, la demanda de metanol durante la etapa de inducción incrementó de acuerdo a una ecuación polinomial de segundo orden ($r^2 > 0.990$), con una demanda de metano inicial de 0.01-0.19 mL/min y alcanzando 0.01-0.68 mL/min a las 68 h de inducción (Fig. 31). Los valores de demanda de metanol a las 68 h de inducción se agruparon en tres grupos (0.04 mL/min en promedio para los cultivos A al E, 0.23 mL/min para el cultivo F, y 0.62 mL/min en promedio para los cultivos G al J), donde el primer y el tercer grupo correspondieron a los cultivos de menor y mayor producción de fitasa extracelular, respectivamente, a las 68 h de inducción. En el primer grupo, tres de los cuatro cultivos se realizaron a pH 3, y todos los cultivos del tercer grupo se realizaron a temperaturas por debajo de los 30°C en la etapa de inducción. En la tabla XXII se resumen los parámetros de consumo de metanol.

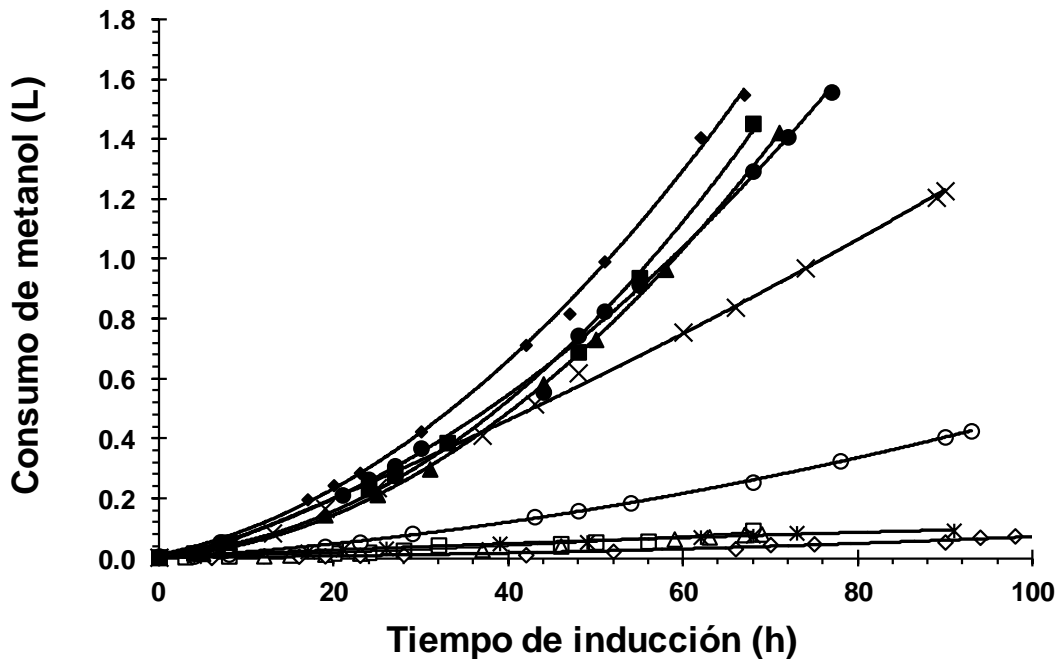


Figura 31. Consumo de metanol a lo largo del tiempo de inducción del gen heterólogo para los diez cultivos realizados con la cepa KM71FTEII a diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción. (*): A; (o): B; (◊): C; (Δ): D; (□): E; (X): F; (■): G; (▲): H; (●): I; (◆): J.

6.1.6 Producción de proteasas totales

Tres (A, B y C) de los diez cultivos realizados presentaron mayor actividad de proteasas en el medio de cultivo libre de células a lo largo del tiempo de inducción (Fig. 32), siendo el valor máximo de 34.9 mU/L a las 68 h de inducción en el cultivo A. El resto de los cultivos presentaron una actividad de proteasas en un intervalo de 0.0 a 28.9 mU/L a las 68 h de inducción. Dos de los cultivos (B y C) que presentaron mayor actividad de proteasas se llevaron a cabo a 30°C. El cultivo E también se realizó a 30°C, sin embargo éste se realizó en presencia de sorbitol. El cultivo A fue el único cultivo que se realizó a un pH de 7. El cultivo con mayor producción de fitasa extracelular presentó una actividad de proteasas a las 68 h de 4.0 mU/L, valor 3.5 veces menor que el del cultivo que presentó menor actividad de proteasas (cultivo D), el cual se realizó en presencia de sorbitol.

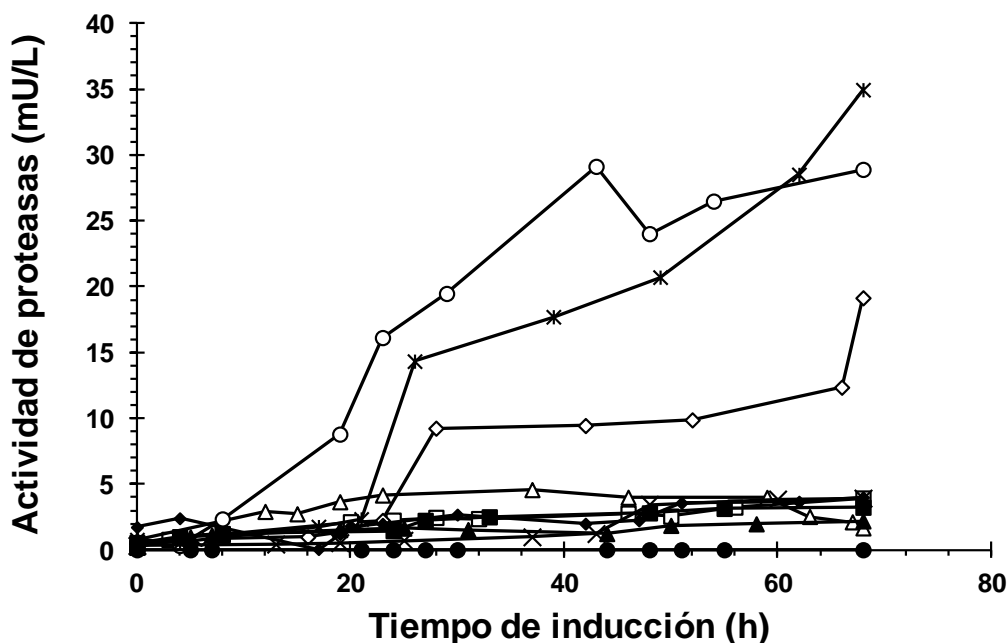


Figura 32. Actividad de proteasas a lo largo del tiempo de inducción del gen heterólogo para los diez cultivos realizados con la cepa KM71FTEII a diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción. (*): A; (o): B; (◇): C; (Δ): D; (□): E; (X): F; (■): G; (▲): H; (●): I; (◆): J.

6.1.7 Secreción de fitasa

Los cultivos de mayor producción de fitasa extracelular presentaron a su vez la mayor secreción porcentual de fitasa, en un intervalo a las 68 h de 88.7 a 85.1%. Por otro lado, los cultivos que presentaron el porcentaje de secreción más bajo fueron también los de producción de fitasa extracelular más baja con un valor mínimo de 55.3% a las 68 h de cultivo. Todos los cultivos del grupo de mayor secreción se cultivaron a una temperatura menor de 30°C. Los tres cultivos de menor producción de fitasa extracelular, además de haber sido cultivados a 30°C, también se utilizó un pH de 3 (Fig. 33).

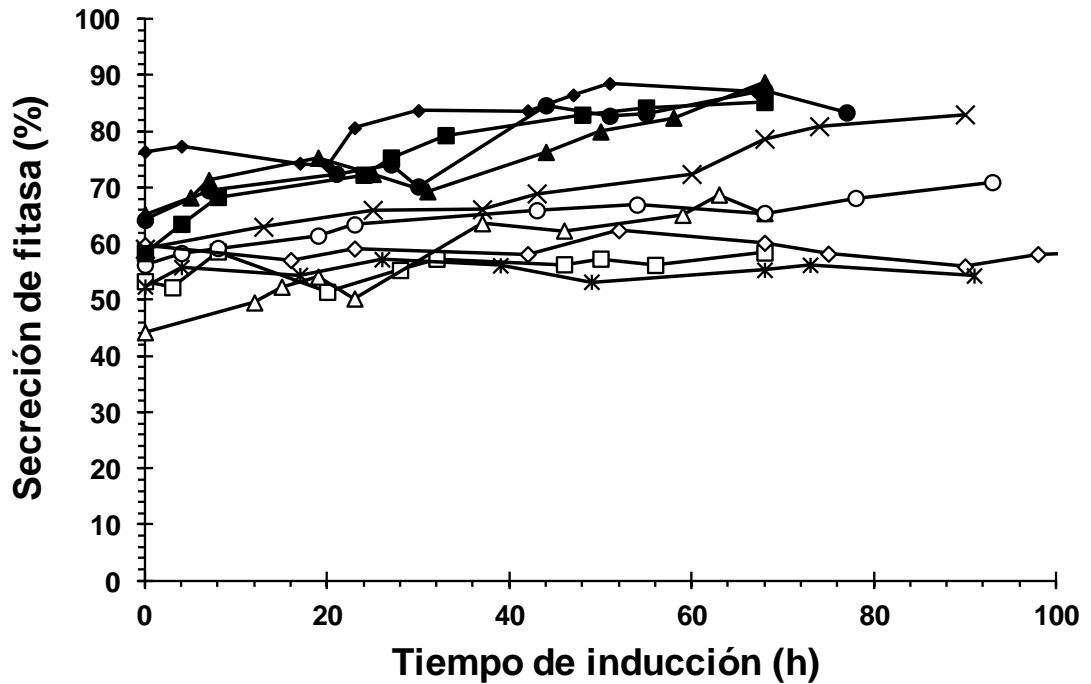


Figura 33. Secreción de fitasa lo largo del tiempo de inducción del gen heterólogo para los diez cultivos realizados con la cepa KM71FTEII a diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción. (*): A; (o): B; (◇): C; (Δ): D; (□): E; (X): F; (■): G; (▲): H; (●): I; (◆): J.

6.2 Correlación de la respuesta fisiológica con el aumento de la producción extracelular de fitasa

6.2.1 Comportamiento de las condiciones de cultivo en la optimización de la producción de fitasa extracelular

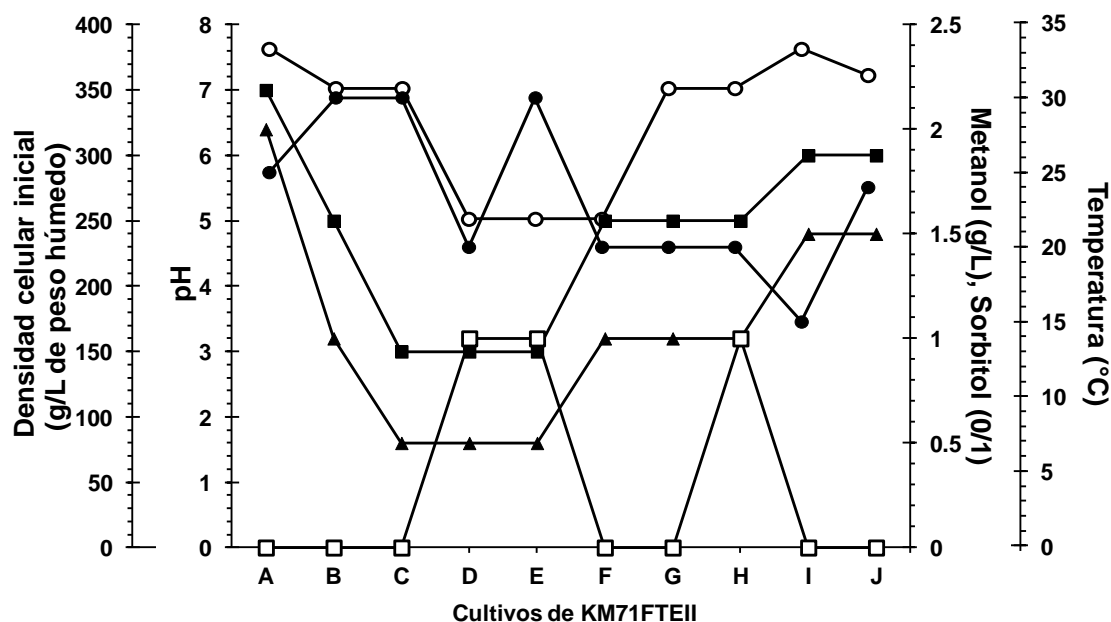


Figura 33. Comportamiento de las condiciones de cultivo en la producción de fitasa extracelular. Los cultivos están ordenados de menor a mayor producción de fitasa extracelular. Sorbitol (0/1) (□) temperatura (°C) (●), pH (■), concentración de metanol (g/L) (▲) y densidad celular al inicio de la etapa de inducción (g/L peso seco) (○).

La Fig. 33 muestra el efecto de las condiciones de cultivo respecto a la producción total de fitasa extracelular. La concentración de metanol y el pH fueron disminuyendo para luego aumentar hasta un valor final intermedio para el cultivo de mayor producción de fitasa extracelular (pH 6 y 1.5 g/L). La temperatura tuvo un comportamiento similar, tendiendo a mostrar valores altos durante los primeros cultivos para luego disminuir y aumentar hasta un valor intermedio en el cultivo de mayor producción de fitasa extracelular (24°C). La densidad celular inicial tendió a valores

mayores de 350 g/L de peso húmedo (88 g/L de peso seco) durante los cuatro cultivos con mayor producción de fitasa extracelular.

6.2.2 Comportamiento del consumo de metanol, producción de proteasas, secreción de fitasa, crecimiento celular (μ) y rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$) durante la optimización de la producción de fitasa extracelular

La Fig. 34 muestra el consumo de metanol, valores de μ , actividad de proteasas extracelular en el medio de cultivo, el porcentaje de secreción de fitasa y valores de $Y_{p/x}$ a las 68 h de inducción para los diez cultivos realizados con la cepa KM71FTEII. Los cultivos se ordenaron de menor a mayor producción de fitasa extracelular. El incremento en la producción de fitasa extracelular a través del proceso de optimización correlacionó con un incremento en el consumo de metanol de hasta 1.6 L, un incremento en los valores de μ alcanzando un máximo de 0.013-0.017 h⁻¹, una disminución en la actividad de proteasas en el medio de cultivo y un incremento en la secreción de fitasa hasta 88%. Además, el incremento en la producción de fitasa extracelular correlacionó con un incremento en el valor de $Y_{p/x}$ (152.2 a 680.8 U/g de peso húmedo). El rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$) de los cultivos sin sorbitol estuvo entre 234 y 148 gramos de peso seco por litro de metanol, excluyendo a los cultivos D, E y H que tuvieron también sorbitol como fuente de carbono y al cultivo A que mostró un rendimiento $Y_{x/s}$ negativo. Todos los parámetros relacionados a lo tratado en esta sección se resumen en la tabla XXIII.

Tabla XXIII

Producción total de fitasa, consumo de metanol, velocidad específica de crecimiento, actividad extracelularde proteasas, porcentaje de secreción de fitasa, y rendimiento producto-biomasa a las 68 h de inducción de los cultivos con la cepa KM71FTEII bajo diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción.

Cultivo	Actividad extracelular total (U)	Metanol añadido (L)	μ (h⁻¹)	Actividad de proteasas (mU/L)	Secreción de fitasa (%)	Y p/x (U/g^a)	Y x/s (g^a /L)
B	63,881	0.25	0.005	28.9	58.3	243	118.3
C	66,288	0.04	-0.0002	19.1	60.1	284	192.7
D	68,202	0.08	0.004	2.9	65.3	305	* ₋
E	69,243	0.09	0.0025	4.6	65.4	368	* ₋
F	82,509	0.81	0.013	3.9	78.6	215	148.6
G	171,784	1.44	0.017	3.1	85.4	380	156.9
H	177,944	1.42	0.013	2.2	88.6	340	* ₋
I	230,621	1.29	0.013	0.0	87.3	453	234.5
A	32,106	0.07	-0.003	34.9	55.3	153	-486.0
J	347,682	1.55	0.013	4.0	87.1	681	176.8

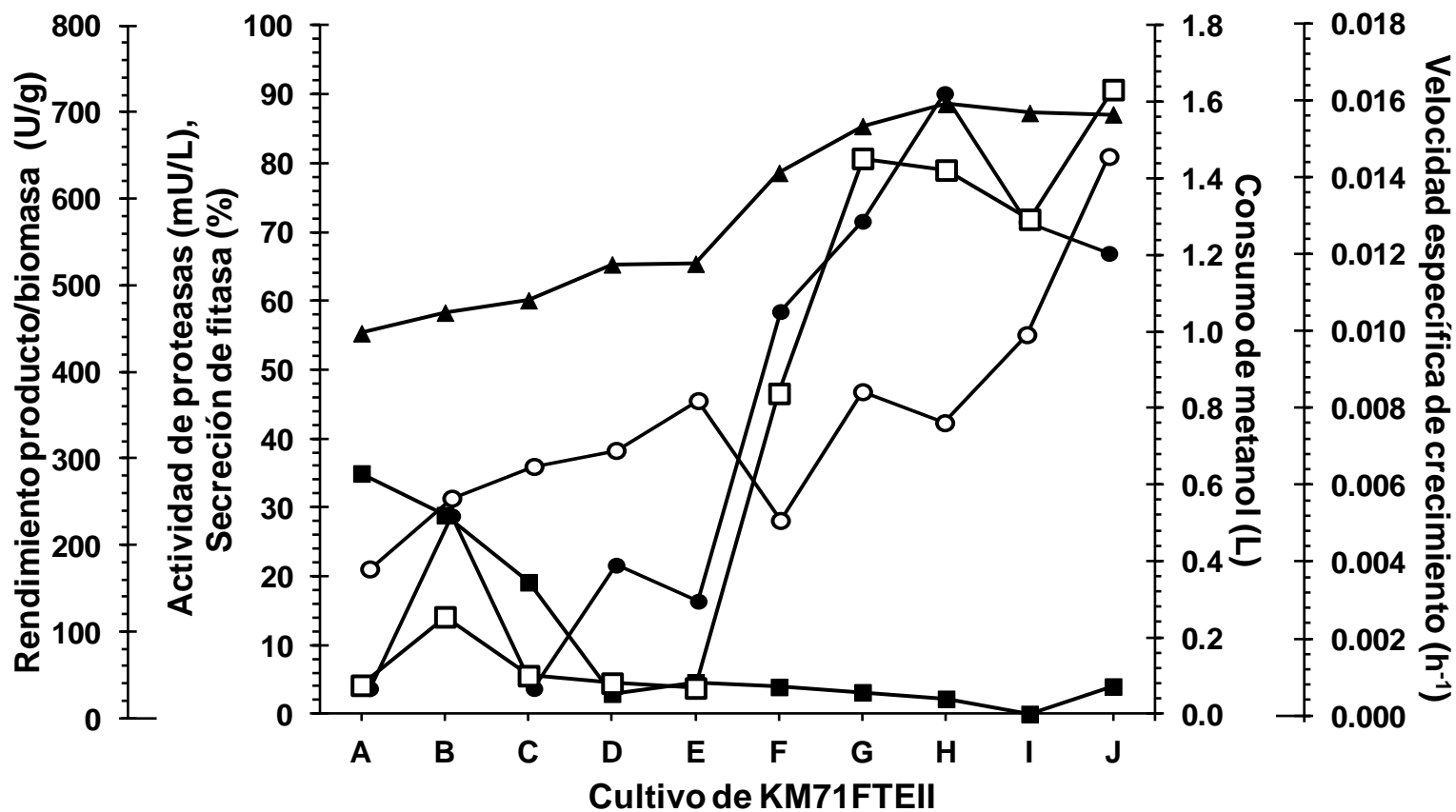


Figura 34. Consumo de metanol (□), velocidad específica de crecimiento, μ (●), actividad extracelular de proteasas (■), porcentaje de secreción de fitasa (▲), y rendimiento producto-biomasa (○) a las 68 h de inducción de los cultivos con la cepa KM71FTEII bajo diferentes condiciones de cultivo en la etapa de inducción.

6.3 Análisis de la expresión de genes involucrados en la producción y secreción de la fitasa recombinante y correlación con la respuesta fisiológica del hospedero y la producción de fitasa extracelular

6.3.1 Resumen del análisis de parámetros fisiológicos y producción de fitasa extracelular

En la tabla XXIV se resumen los valores de parámetros fisiológicos y producción de fitasa extracelular, que fueron usados posteriormente para la correlación con la expresión de genes. La producción de fitasa extracelular de los cultivos CM fue significativamente mayor a la de los cultivos CP además de presentar valores de producción similares a aquellos en el cultivo Simplex con condiciones idénticas (promedio CM= 390,440 U, Simplex J = 347, 681 U, promedio CP =69,335, Simplex C= 66,288 U). Así mismo, el resto de los parámetros seleccionados para la comparación presentaron valores similares los correspondientes en los cultivos de optimización Simplex.

Tabla XXIV

Determinación de parámetros fisiológicos seleccionados para el análisis y comparación con su cultivo correspondiente al simplex. Los valores para los cultivos CM y CP representan el promedio de tres cultivos independientes.

Actividad extracelular total (U)		Biomasa total (g)		Metanol añadido (L)		Secreción de fitasa (%)		Actividad de proteasas (mU/L)	
CM promedio	Simplex J	CM promedio	Simplex J	CM Promedio	Simplex J	CM Promedio	Simplex J	CM Promedio	Simplex J
390,440	347,682	258.3	247.7	1.54	1.53	87.4	87.1	8.5	*4.0
CP promedio	Simplex C	CP promedio	Simplex C	CP promedio	Simplex C	CP promedio	Simplex C	CP promedio	Simplex C
69,935	66,288	-8.5 ^a	6.7	0.08	0.04	56.3	60.1	26.1	*19.1

*El protocolo fue distinto para el punto de 68 h en este cultivo.

^aLa diferencia entre la biomasa inicial en la inducción fue mayor a la biomasa final, por ello el numero es negativo

6.3.2 Selección de genes y diseño de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis específicos para los genes a analizar

Se seleccionaron un total de 7 genes relacionados con las rutas metabólicas de proteólisis, secreción y metabolismo del metanol: el gen *AOX2*, que codifica para la enzima AOX2, responsable del metabolismo del metanol en las cepas KM71 de *P. pastoris*; el gen *PEP4*, gen que codifica para la proteinasa A, principal proteasa aspártica vacuolar en *P. pastoris*; el gen *PRB1*, que codifica para la proteinasa B, principal serín-proteasa vacuolar en *P. pastoris*; el gen *PRC1*, que codifica para la carboxipeptidasa Y, proteasa vacuolar que procesa el extremo C-terminal de proteínas; el gen *KEX2*, que codifica para la proteasa KEX2, involucrada en el procesamiento del propéptido del factor alfa de *S. cerevisiae*; el gen *KAR2*, que codifica para la chaperona BiP, proteína principal responsable del plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico; y el gen *FTEII*, que codifica para la fitasa FTEII clonado en la cepa KM71FTEII de *P. pastoris*. Además, como genes normalizadores se seleccionaron dos genes reportados como constitutivos en *P. pastoris*: el gen *G6PD*, que codifica para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima de la vía de las pentosas fosfato; y el gen *YPT1*, que codifica para una GTPasa implicada en el proceso de secreción. Se diseñaron un total de nueve pares de oligonucleótidos específicos en base a las secuencias genómicas reportadas en GenBank (Tabla XXVI). Todos los oligonucleótidos fueron diseñados para hibridar en la región CDS de la secuencia de cada gen, excepto en el caso del oligonucleótido para *AOX2*, cuya hibridación fue dirigida a la región 5' no traducible del gen.

En la evaluación de la especificidad, no se encontraron alineamientos inespecíficos de los oligonucleótidos diseñados con otras secuencias de *P. pastoris* que no fueran la secuencia blanco para las cuales fueron diseñados, cada par de oligonucleótidos hibridó en la misma secuencia y en cadenas complementarias (Fig. 35).

En la evaluación de la formación de estructuras secundarias de tipo horquilla, homodímeros y heterodímeros, no se encontraron valores de ΔG menores a -10 kcal/mol en ninguno de los oligonucleótidos (Tabla XXV), excepto en el oligonucleótido 3' del gen *PRC1*, el cual presentó un valor de -10.76 kcal/mol para la formación de homodímeros. Este valor fue considerado como dentro de los límites tolerables.

Tabla XXV

Formación de estructuras secundarias de tipo horquilla, homodímero y heterodímero de las secuencias de los oligonucleótidos diseñados.

Gen	Oligonucleótido	ΔG (kcal/mol)		
		Horquilla	Homodímero	Heterodímero
<i>KEX2</i>	3'	0.06	-3.61	-5.12
	5'	1.37	-3.61	
<i>AOX2</i>	3'	-1.76	-5.47	-7.2
	5'	-0.73	-4.85	
<i>PEP4</i>	3'	-0.97	-3.53	-8.51
	5'	-0.36	-5.36	
<i>PRC1</i>	3'	-1.09	-10.76	-8.07
	5'	0.04	-6.14	
<i>PRB1</i>	3'	-3.02	-7.05	-4.41
	5'	-0.56	-4.85	
<i>YPT1</i>	3'	-0.14	-6.3	-4.87
	5'	-2.88	-6.68	
<i>KAR2</i>	3'	-0.28	-9.28	-3.53
	5'	-1.54	-3.53	
<i>G6PD</i>	3'	-1.18	-3.3	-6.01
	5'	0.59	-4.85	
<i>GAP</i>	3'	-0.59	-6.34	-5.47
	5'	-2.00	-4.67	
<i>FTEII</i>	3'	-2.91	-4.74	-6.46
	5'	-1.83	-3.65	

Tabla XXVI

Genes seleccionados en el estudio y secuencia de oligonucleótidos específicos.

Número de acceso GenBank	Gen	Proteína	Secuencia (pb)	Oligonucleótido 5'	Oligonucleótido 3'	Amplicón (pb)
<u>XM_002491154.1</u>	<i>KEX2</i>	Propeptidasa	2334	gccactttttcgtcttctct	gaagtctcttttacatccgtttcc	65
<u>U96968.1</u>	<i>AOX2</i>	Alcohol oxidasa 2	420	acgggcttttaactacattgttct	tgtagtcaatacagttgatccgaaa	75
<u>XM_002493288.1</u>	<i>PEP4</i>	Proteinasa A	1246	gatccgaatatgctgaattgc	ggcaaagcaatcaatgaggt	70
<u>XM_002490083.1</u>	<i>PRC1</i>	Carboxipeptidasa Y	1572	cgctcagatgggacccta	ggatccaccatcacattct	73
<u>XM_002489831.1</u>	<i>PRB1</i>	Proteinasa B	1680	ttaagggtctaccgtaaca	cattgactgcaaggtccaaa	69
<u>XM_002493580.1</u>	<i>YPT1</i>	GTPasa	567	gcggtcaagctagtgttct	tgctgacaaaacgtaaacca	70
<u>XM_002490982.1</u>	<i>KAR2</i>	Chaperona BiP	2037	gtccatccatcaacaatga	ctcggcctttcaaccatac	73
<u>XM_002491158.1</u>	<i>G6PD</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	1515	ttaagccaggttctaaatgtgtca	ttcccacctttctgtgttga	68
<u>HM755449.1</u>	<i>FTEII</i>	Fitasa termoestable II	1068	tgacgacgagtacggttctt	tggtcagcagagaacttcc	70

<i>prb1</i>	<p>Score = 42.1 bits (21), Expect = 1e-04 Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%) Strand=Plus/Plus</p> <p>Query 21 TTAAGGGCTCTACCGCTAACA 41 Sbjct 1007 TTAAGGGCTCTACCGCTAACA 1027</p>	<p>Score = 40.1 bits (20), Expect = 6e-04 Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%) Strand=Plus/Minus</p> <p>Query 1 CATTGACTGCAAGGTCCAAA 20 Sbjct 1075 CATTGACTGCAAGGTCCAAA 1056</p>
<i>ypt1</i>	<p>Score = 44.1 bits (22), Expect = 4e-05 Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%) Strand=Plus/Plus</p> <p>Query 20 CAGCGGTCAAGCTAGTGCTTCT 41 Sbjct 23 CAGCGGTCAAGCTAGTGCTTCT 44</p>	<p>Score = 42.1 bits (21), Expect = 1e-04 Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%) Strand=Plus/Minus</p> <p>Query 1 TGCTGACAAAACGTAAAACCA 21 Sbjct 94 TGCTGACAAAACGTAAAACCA 74</p>
<i>kar2</i>	<p>Score = 42.1 bits (21), Expect = 1e-04 Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%) Strand=Plus/Plus</p> <p>Query 21 GTCCATCACCATCAACAATGA 41 Sbjct 1590 GTCCATCACCATCAACAATGA 1610</p>	<p>Score = 42.1 bits (21), Expect = 1e-04 Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%) Strand=Plus/Minus</p> <p>Query 1 CTCGGCTCTTCAACCATACG 21 Sbjct 1662 CTCGGCTCTTCAACCATACG 1642</p>
<i>g6pd</i>	<p>Score = 48.1 bits (24), Expect = 3e-06 Identities = 24/24 (100%), Gaps = 0/24 (0%) Strand=Plus/Plus</p> <p>Query 21 TTAAGCCAGGTTCTAAATGTGTC 44 Sbjct 932 TTAAGCCAGGTTCTAAATGTGTC 955</p>	<p>Score = 42.1 bits (21), Expect = 2e-04 Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%) Strand=Plus/Minus</p> <p>Query 1 TTCCACCTTCTGTGTGAT 21 Sbjct 999 TTCCACCTTCTGTGTGAT 979</p>
<i>kex2</i>	<p>Score = 50.1 bits (25), Expect = 5e-06 Identities = 25/25 (100%), Gaps = 0/25 (0%) Strand=Plus/Minus</p> <p>Query 1 GAAGTCTCTTTTACATCCGTTCCG 25 Sbjct 1967 GAAGTCTCTTTTACATCCGTTCCG 1943</p>	<p>Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.001 Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%) Strand=Plus/Plus</p> <p>Query 25 GCCACTTTTTCGTCTTCCTCT 45 Sbjct 1903 GCCACTTTTTCGTCTTCCTCT 1923</p>
<i>aox2</i>	<p>Score = 54.0 bits (27), Expect = 4e-07 Identities = 27/27 (100%), Gaps = 0/27 (0%) Strand=Plus/Plus</p> <p>Query 23 AAAACGGGCTTTTAACTACATTGTCT 49 Sbjct 330 AAAACGGGCTTTTAACTACATTGTCT 356</p>	<p>Score = 50.1 bits (25), Expect = 6e-06 Identities = 25/25 (100%), Gaps = 0/25 (0%) Strand=Plus/Minus</p> <p>Query 1 TGTAGTCAATACAGTTGATCCGAAA 25 Sbjct 407 TGTAGTCAATACAGTTGATCCGAAA 383</p>
<i>pep4</i>	<p>Score = 42.1 bits (21), Expect = 1e-04 Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%) Strand=Plus/Plus</p> <p>Query 21 GATCCGAATATGCTGAATTGC 41 Sbjct 854 GATCCGAATATGCTGAATTGC 874</p>	<p>Score = 40.1 bits (20), Expect = 6e-04 Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%) Strand=Plus/Minus</p> <p>Query 1 GGCAAAGCAATCAATGAGGT 20 Sbjct 923 GGCAAAGCAATCAATGAGGT 904</p>
<i>prc1</i>	<p>Score = 40.1 bits (20), Expect = 5e-04 Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%) Strand=Plus/Minus</p> <p>Query 1 GGATCCACCATCACATTCCT 20 Sbjct 1107 GGATCCACCATCACATTCCT 1088</p>	<p>Score = 36.2 bits (18), Expect = 0.008 Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%) Strand=Plus/Plus</p> <p>Query 21 CGCTCAGATGGGACCCTA 38 Sbjct 1035 CGCTCAGATGGGACCCTA 1052</p>
<i>gap</i>	<p>Score = 48.1 bits (24), Expect = 3e-06 Identities = 24/24 (100%), Gaps = 0/24 (0%) Strand=Plus/Plus</p> <p>Query 22 GGAGACTACCTACGAGGAGATCAA 45 Sbjct 750 GGAGACTACCTACGAGGAGATCAA 773</p>	<p>Score = 42.1 bits (21), Expect = 2e-04 Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%) Strand=Plus/Minus</p> <p>Query 1 AAAACACCCTTGAGCTTACCC 21 Sbjct 818 AAAACACCCTTGAGCTTACCC 798</p>
<i>fell</i>	<p>Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.047 Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%) Strand=Plus/Plus</p> <p>Query 20 CTGACGACGAGTACGGTTCTTT 41 Sbjct 576 CTGACGACGAGTACGGTTCTTT 597</p>	<p>Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.74 Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%) Strand=Plus/Minus</p> <p>Query 1 TGGCTCAGCAGAGAACTTCC 20 Sbjct 646 TGGCTCAGCAGAGAACTTCC 627</p>

Figura 35. Alineamientos en blast-n de los oligonucleótidos diseñados con su secuencia blanco correspondiente en el genoma de *P. pastoris*.

6.3.3 Calidad del RNA total extraído

En la tabla XXVII se muestra la calidad (coeficiente 280/260) y concentración de RNA. Todas las muestras presentaron un valor de 280/260 mayor a 1.94 hasta un valor de 2.85. A su vez, la cantidad de RNA total fue muy variable presentando 143.4 ng/μL, nn el valor mas alto y 20.8 ng/μL para el valor más bajo.

Tabla XXVII

Cantidad y calidad del RNA total extraído para las muestras de alta y baja producción de fitasa extracelular.

Tiempo de inducción (h)	CM1		CM2		CM3	
	ng/μL	A260/A280	ng/μL	A260/A280	ng/μL	A260/A280
0	143.4	2.1	127.5	2.2	131.2	2.2
22	96.0	2.1	93.8	2.2	90.7	2.2
31	54.8	2.1	74.2	2.2	71.3	2.2
47	83.8	2.0	82.0	2.2	83.4	2.2
68	49.9	2.1	103.0	2.1	105.6	2.1
Tiempo inducción (h)	CP1		CP2		CP3	
	ng/μL	A260/A280	ng/μL	A260/A280	ng/μL	A260/A280
0	42.9	2.3	136.0	2.2	135.0	2.1
22	120.0	2.3	113.0	2.0	71.5	2.2
31	97.4	2.0	57.7	1.9	35.9	2.3
47	77.8	2.0	40.1	2.1	21.2	2.4
68	87.4	2.1	58.5	2.1	20.8	2.9

La figura 36 muestra uno de los 30 electroferogramas (los 29 electroferogramas restantes se muestran en el anexo II) que se utilizaron para determinar la integridad del RNA total en todas las muestras (RIN), el coeficiente de integridad para todas las muestras se enlista a su vez en la tabla XXVIII. Los valores de los RIN estuvieron comprendidos entre 4.8 y 7.8. Las electroforesis digitales se muestran en las figuras 37 y 38.

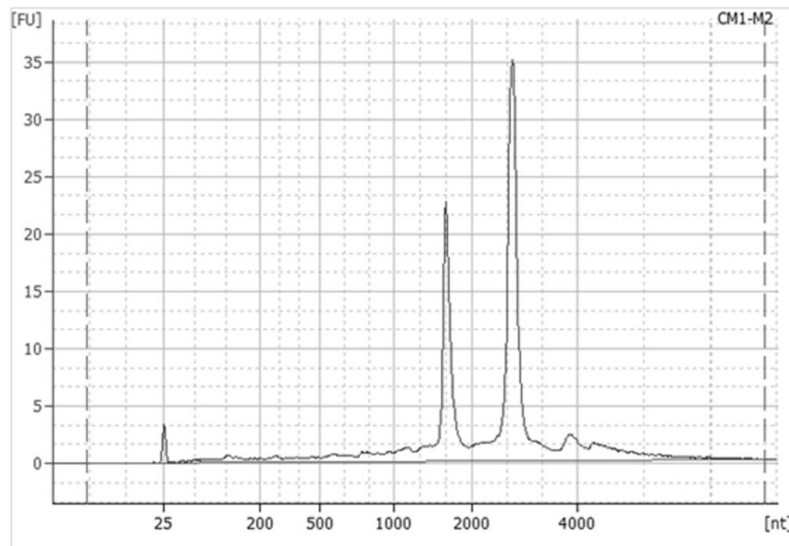


Figura 36. Electroferograma del RNA total de la muestra de 22 h de inducción del primer cultivo en condiciones de alta producción de fitasa extracelular. Los dos picos altos corresponden a los RNA ribosomales 18S y 26S, respectivamente. El resto de los electroferogramas se muestran en el anexo II.

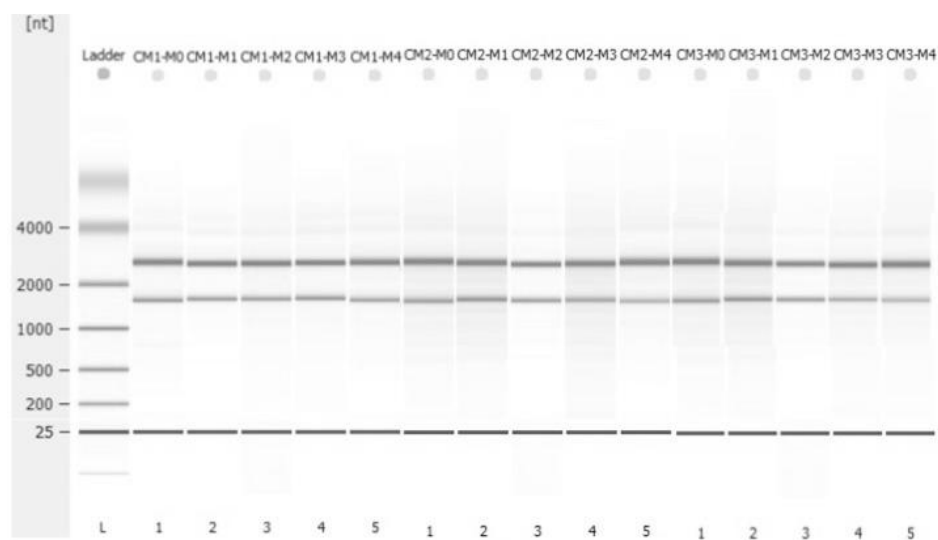


Figura 37. Geles de electroforesis digital obtenidos mediante análisis de microfluidos de las preparaciones de RNA obtenidas de los cultivos 68 h de inducción. Cultivos CM rRNA 26S (banda superior) y 18S (banda inferior).

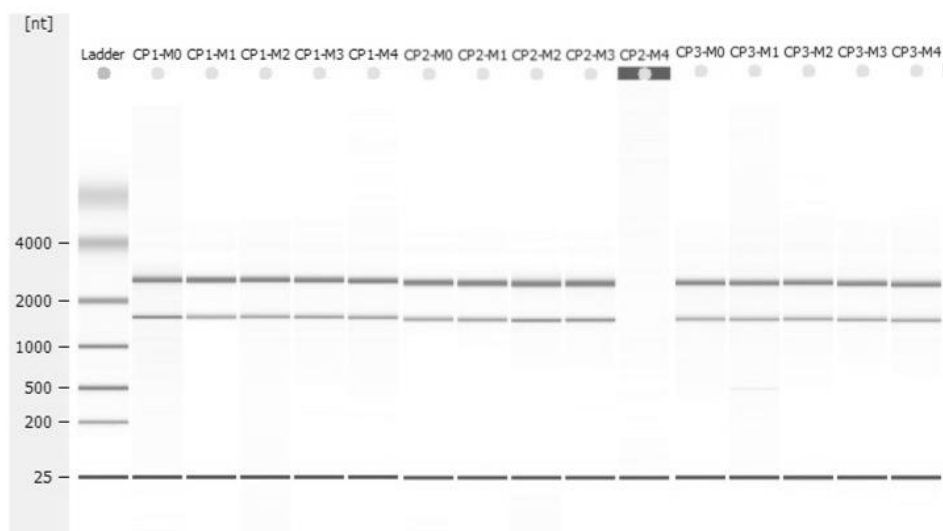


Figura 38. Geles de electroforesis digital obtenidos mediante análisis de microfluidos de las preparaciones de RNA obtenidas de los cultivos. 68 h de inducción. Cultivos CP, rRNA 26S (banda superior) y 18S (banda inferior).

Tabla XXVIII

Índice de integridad de RNA total extraído para las muestras de alta y baja producción de fitasa extracelular.

Tiempo inducción (h)	CM			CP		
	1	2	3	1	2	3
0	7.0	6.2	6.1	7.7	7.5	7.0
22	7.3	6.5	6.5	6.7	6.8	7.4
31	6.6	7.6	7.5	7.1	7.8	6.7
47	7.2	4.8	6.4	6.4	6.1	6.8
68	6.7	5.8	5.1	7.1	6.8	7.0

6.3.4 Especificidad de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis

Todos los genes cuya detección se realizó con SYBR green mostraron una curva de curva de disociación con un único pico (Fig. 39), lo que garantizó la ausencia de la amplificación de productos inespecíficos y de dímeros de iniciadores, y por lo tanto la especificidad de los iniciadores. Las temperaturas de disociación de los productos amplificados de cada transcrito estuvieron comprendidas entre 79 y 82°C.

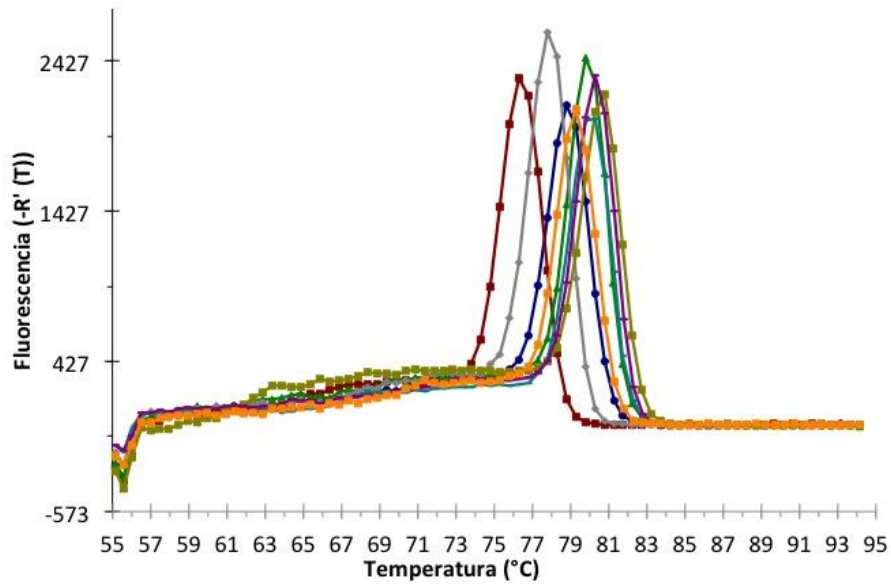


Figura 39. Curva de disociación del producto formado en la amplificación del transcrito de los genes de estudio empleando SYBR green para su detección. AOX2 (Rojo), PRC1 (Gris), KEX2 (Azul), PEP4 (Naranja), KAR2 (Verde), G6PD (Cyan), YPT1 (morado), PRC1 (Verde olivo). El resto de las curvas de amplificación se muestran en el Anexo II.

6.3.5 Determinación de la eficiencia, linealidad e intervalos lineales para los genes en estudio en los ensayos de qPCR

Todas las curvas de amplificación de los diferentes transcritos obtenidas a partir de diluciones seriadas del DNAc en las muestras de 68 h de inducción con metanol mostraron un comportamiento similar (Figura 40, ver resto en el Anexo II), lo que generó correlaciones de C_T respecto al logaritmo de la cantidad equivalente de RNA con R^2 mayores de 0.983, y eficiencias de amplificación comprendidas entre 90.3 y 101.3% (Tabla XXIX).

Tabla XXIX

Valores de Eficiencia (E), linealidad (r^2) y el intervalo de linealidad (C_T) para cada uno de los genes en estudio en los ensayos de qPCR.

Gen	Eficiencia (%)	Linealidad (R^2)	Intervalo linealidad (C_T)	
<i>KEX2</i>	101.3	0.998	27.1	36.2
<i>AOX2</i>	92.3	0.992	22.7	32.4
<i>PEP4</i>	98.6	0.988	18.7	25.8
<i>PRC1</i>	92.6	0.996	25.0	32.1
<i>PRB1</i>	95.0	0.995	22.8	29.9
<i>YPT1</i>	92.1	0.983	25.6	34.7
<i>KAR2</i>	96.8	0.994	22.5	31.7
<i>G6PD</i>	93.1	0.992	24.6	34.0
<i>FTEII</i>	90.3	0.990	18.9	28.7
<i>GAP</i>	92.0	0.996	25.7	35.3

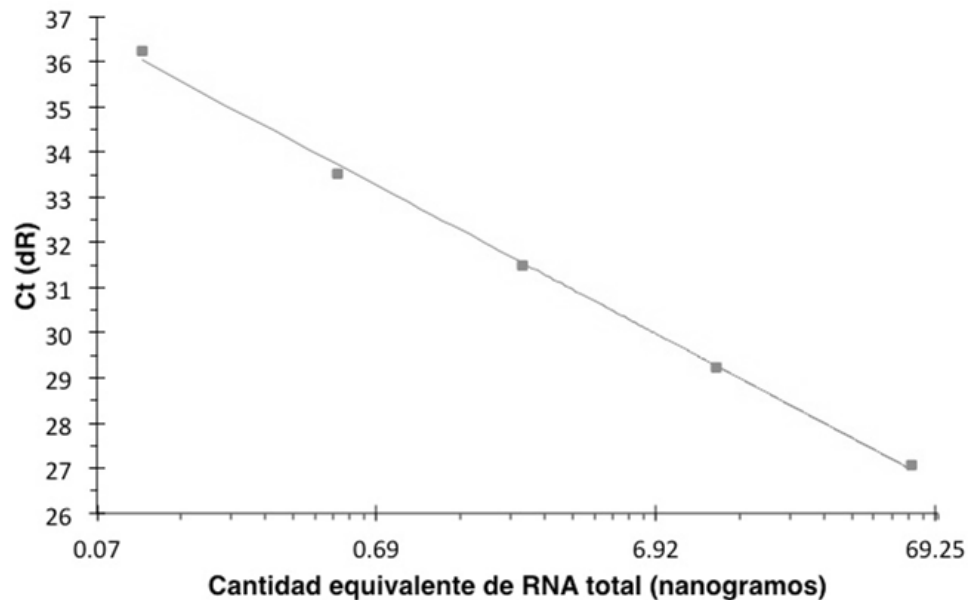


Figura 40. Correlación de los valores del ciclo umbral (C_T) respecto al logaritmo de la cantidad equivalente de RNA, obtenida a partir de las curvas de amplificación del transcrito correspondiente al gen *kex2* de diluciones seriadas del DNAc de 68 h de inducción correspondiente al cultivo CM1 de fitasa. El resto de las correlaciones se muestran en el anexo II.

6.3.6 Testigos negativos de la RT-qPCR y análisis de genes normalizadores

Se observó la ausencia de amplificación en los controles negativos de PCR (sin DNAc) y en los ensayos negativos de retrotranscripción (qPCR directo del RNA sin la etapa de retrotranscripción) en todas las muestras evaluadas de cada cultivo analizado, excepto en algunas muestras en las cuales se detectó amplificación, la cual se presentó 10 ciclos o más después del ciclo de amplificación de la muestra, por lo que, de acuerdo al manual del equipo de qPCR de Agilent, siendo la diferencia de ciclos mayor a 10 no se consideró como significativo (Anexo II).

El estudio de los genes normalizadores demostró que la combinación de los genes *YPT1* y *G6PD* como genes normalizadores es la más adecuada para evaluar la expresión de los siete genes en estudio, ya que generan la menor variación conjunta de los resultados en los niveles de expresión relativa de todos los genes analizados. Para la combinación de los genes *YPT1* y *G6PD* en el tiempo de 22 h de inducción con metanol se encontró una media del coeficiente de variación de 20.0, a las 30 h la media fue de 27.0, a las 47 h de 37.2 y por último a las 68 h la variación calculada fue de 52.1. El uso del gen *GAP* como normalizador llevó a la variación más alta en los resultados de los niveles de expresión (Tabla XXX).

Tabla XXX

Media del coeficiente de variación (%) de los niveles de expresión relativa de los genes en estudio empleando diferentes combinaciones de normalizadores a lo largo del primer cultivo independiente de alta producción de fitasa extracelular.

Genes normalizadores	Media de CV%			
	22 h	30 h	47 h	68 h
<i>YPT1</i>	20.0	25.6	35.9	51.4
<i>YPT1, G6PD</i>	20.0	27.0	37.2	52.0
<i>G6PD</i>	20.1	27.3	38.1	52.1
<i>YPT1, G6PD, GAP</i>	21.5	29.8	40.4	52.1
<i>G6PD, GAP</i>	22.4	30.6	42.4	54.0
<i>YPT1, GAP</i>	23.5	31.6	42.9	54.1
<i>GAP</i>	29.0	52.4	59.5	85.7

6.3.7 Comparación de los niveles de expresión relativa de los genes en estudio

Los niveles de expresión del gen *KEX2* a lo largo del cultivo se encuentran en la tabla XXXI. Este gen presentó un comportamiento a lo largo del cultivo CM con un incremento desde el inicio de la inducción con metanol (0 h) hasta las 47 h de inducción con valores de expresión de 2.6, seguido de un descenso en los niveles de expresión a las 68 h con valores de 1.8. En los cultivos CP se observó una disminución en los niveles de expresión desde el tiempo de 0 h con valores de 0.8 hasta las 68 h con valores de 0.5. No se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de los tiempos contiguos para ninguna de las condiciones de cultivo evaluadas (Tablas XXXVIII y XXXIX).

Tabla XXXI

Niveles de expresión relativa del gen *KEX2* a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.

Tiempo (h)	<i>KEX2</i>							
	CM1	CM2	CM3	Media	CP1	CP2	CP3	Media
22	1.5	1.8	1.4	1.6	0.5	1.7	0.2	0.8
30	1.6	1.2	2.2	1.7	0.4	0.7	0.4	0.5
47	1.6	3.1	2.8	2.6	0.7	0.8	0.2	0.6
68	0.5	2.6	2.4	1.8	0.8	0.5	0.2	0.5

Los niveles de expresión del gen *AOX2* se encuentran en la tabla XXXII. Este gen presentó un comportamiento similar a lo largo del cultivo en ambas condiciones, presentándose un incremento a las 47 h de con valores de expresión de 10.4 para el cultivo CM y de 10.7 para el cultivo CP, seguido por una disminución en los niveles de expresión a las 68 h a valores de 8.4 para el cultivo CM y de 7.6 para el cultivo CP. En la comparación de los niveles de expresión a lo largo del cultivo, el gen *AOX2* fue uno de los pocos casos en los cuales se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los tiempos contiguos ($P \leq 0.01$), estas diferencias se presentaron en el cultivo CP al comparar los tiempos de 22 con 30 h, y 30 con 47 h (LVIII). No se encontraron diferencias significativas al analizar los tiempos contiguos del cultivo CM (Tablas XXXVIII y XXXIX).

Tabla XXXII

Niveles de expresión relativa del gen *AOX2* a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.

<i>AOX2</i>								
Tiempo (h)	CM1	CM2	CM3	Media	CP1	CP2	CP3	Media
22	3.5	6.1	7.9	5.8	3.9	4.4	14.7	7.6
30	5.2	11.0	7.4	7.8	2.1	2.8	12.7	5.9
47	3.6	19.2	8.4	10.4	5.9	7.4	18.8	10.7
68	2.8	13.8	8.5	8.4	7.7	8.7	6.3	7.6

Los niveles de expresión del gen *PEP4* se encuentran en la tabla XXXIII. En el cultivo CM, se observó un aumento en los niveles de expresión a lo largo del cultivo hasta llegar a las 68 h con valores de expresión de 1.9. Mientras que en el cultivo CP los niveles de expresión fueron disminuyendo desde el inicio de la etapa de inducción hasta las 68 h con valores de 0.02. Nuevamente, no se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de los tiempos contiguos para ninguna de las condiciones de cultivo evaluadas (Tablas XXXVIII y XXXIX).

Tabla XXXIII

Niveles de expresión relativa del gen *PEP4* a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.

<i>PEP4</i>								
Tiempo (h)	CM1	CM2	CM3	Media	CP1	CP2	CP3	Media
22	1.1	1.1	1.1	1.1	0.04	0.01	0.01	0.02
30	1.7	1.0	1.0	1.2	0.03	0.01	0.04	0.03
47	1.7	1.7	1.9	1.8	0.03	0.01	0.01	0.02
68	1.0	1.6	3.1	1.9	0.03	0.01	0.02	0.02

Los niveles de expresión del gen *PRCI* se encuentran en la tabla XXXIV. En las dos condiciones de cultivo se observó una disminución de los niveles de expresión. En el cultivo CM se encontraron valores de expresión que oscilaron entre 0.7 a las 68 h y 1 a las 47 h. En el cultivo CP se encontraron valores aún menores entre 0.2 a las 47 h y 0.4 a las 22 h. En la comparación de los niveles de expresión en los tiempos contiguos, no se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) en el cultivo CM al comparar los tiempos de 22 y 30 h (Tabla XXXIV). No se encontraron diferencias significativas al analizar los tiempos contiguos del cultivo CP (Tabla XXXIX).

Tabla XXXIV

Niveles de expresión relativa del gen *PRCI* a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.

<i>PRCI</i>								
Tiempo (h)	CM1	CM2	CM3	Media	CP1	CP2	CP3	Media
22	1.2	0.9	0.7	0.9	0.7	0.4	0.1	0.4
30	1.2	0.9	0.6	0.9	0.4	0.2	0.1	0.3
47	1.2	1.1	0.8	1.0	0.3	0.3	0.0	0.2
68	0.3	1.0	0.8	0.7	0.5	0.4	0.1	0.3

Los niveles de expresión para el gen *PRBI* se encuentran en la tabla XXXV. En el cultivo CM se observó un incremento en los niveles de expresión valores de 1.8 a las 47 h de, seguido de un descenso en los niveles a 1.5 a las 68 h, mientras que en el cultivo CP se encontró una disminución de los niveles de expresión en prácticamente todas las etapas de inducción de hasta 0.8 a las 68 h de inducción. Al comparar los niveles de expresión de los tiempos contiguos no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las condiciones de cultivo evaluadas (Tablas XXXVIII y XXXIX).

Tabla XXXV

Niveles de expresión relativa del gen *PRB1* a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.

<i>PRB1</i>								
Tiempo (h)	CM1	CM2	CM3	Media	CP1	CP2	CP3	Media
22	1.4	1.3	1.5	1.4	1.1	0.9	0.5	0.9
30	2.0	1.6	1.4	1.7	0.9	0.7	0.7	0.8
47	1.9	1.9	1.7	1.8	0.7	0.4	0.2	0.4
68	0.6	2.1	1.7	1.5	1.5	0.6	0.3	0.8

Los niveles de expresión para el gen *KAR2* se encuentran en la tabla XXXVI. En el cultivo CM se encontró un aumento en los niveles de expresión relativa en prácticamente todos los tiempos de inducción evaluados con valores de expresión de hasta 9.9 y 8.1 a las 47 y 68 h de inducción, respectivamente, mientras que en el cultivo CP se observó un incremento menor en los niveles de expresión hasta valores de 1.2 a las 22h, seguido de un pequeño aumento hasta valores de 1.2 a las 68 h de inducción. Nuevamente, al comparar los niveles de expresión de los tiempos contiguos no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las condiciones de cultivo evaluadas (Tablas XXXVIII y XXXIX).

Por último, los niveles de expresión para el gen *FTEII* se encuentran en la tabla XXXVII, los cuales mostraron los valores más elevados de todos los genes evaluados en ambas condiciones de cultivo. A lo largo del cultivo CM se presentó un incremento a las 22 h con valores de expresión de 24.9, seguido de una disminución de los niveles de expresión hasta las 68 h con valores de 9.3. Para el cultivo CP se presentó un aumento con valores de 27.5 a las 22 h y una disminución hasta valores de 15 a las 68 h. En la comparación los niveles de expresión de los tiempos contiguos no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las condiciones de cultivo evaluadas (Tablas XXXVIII y XXXIX).

Tabla XXXVI

Niveles de expresión relativa del gen *KAR2* a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.

<i>KAR2</i>								
Tiempo (h)	CM1	CM2	CM3	Media	CP1	CP2	CP3	Media
22	14.5	6.6	7.4	9.5	1.1	0.7	0.1	0.6
30	8.2	5.0	7.6	6.9	1.3	0.7	0.1	0.7
47	16.2	6.2	7.4	9.9	1.8	1.3	0.2	1.1
68	7.2	7.2	8.1	8.1	2.0	1.5	0.1	1.2

Tabla XXXVII

Niveles de expresión relativa del gen *FTEII* a lo largo del cultivo para los cultivos CM y CP.

<i>FTEII</i>								
Tiempo (h)	CM1	CM2	CM3	Media	CP1	CP2	CP3	Media
22	25.6	10.0	38.8	24.8	25.3	14.5	42.6	27.5
30	31.0	8.7	17.0	18.9	29.4	14.1	35.0	26.2
47	19.0	16.7	4.4	13.3	14.4	17.5	10.6	14.2
68	11.6	12.4	3.7	9.2	23.2	9.4	12.3	15.0

Tabla XXXVIII

Diferencias significativas obtenidas de la comparación de la expresión relativa de muestras obtenidas a tiempos de inducción contiguos a lo largo del cultivo CM

Tiempo (h)	CM						
	<i>KEX2</i>	<i>AOX2</i>	<i>PEP4</i>	<i>PRC1</i>	<i>PRB1</i>	<i>KAR2</i>	<i>FTEII</i>
0 y 22	*					*	
22 y 30				**			
30 y 47							
47 y 68							

** $P \leq 0.01$

Tabla XXXIX

Diferencias significativas obtenidas de la comparación de la expresión relativa de muestras obtenidas a tiempos de inducción contiguos a lo largo del cultivo CP

Tiempo (h)	CP						
	<i>KEX2</i>	<i>AOX2</i>	<i>PEP4</i>	<i>PRC1</i>	<i>PRB1</i>	<i>KAR2</i>	<i>FTEII</i>
0 y 22			**				
22 y 30		**					
30 y 47		*					
47 y 68							

* $P \leq 0.05$

** $P \leq 0.01$

6.3.8 Comparación de los niveles de expresión relativa a lo largo del cultivo con los niveles de expresión del tiempo 0 h de inducción con metanol

En la comparación de los niveles de expresión del gen *KEX2* a lo largo del cultivo con los niveles de expresión del inicio de la etapa de inducción con metanol, se encontraron diferencias significativas en el cultivo CM en los tiempos de 22 y 47 ($P \leq 0.05$), en los cuales se observó un aumento en los niveles de expresión relativa de 1.6 a las 22 h y 2.6 a las 47 h (Tabla XL). Para el cultivo CP no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos de inducción al comparar con el inicio de la etapa de inducción con metanol (Tabla XLI).

Para el gen *AOX2*, no se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de expresión con el inicio de la etapa de inducción con metanol en ninguna de las condiciones de cultivo evaluadas, aunque para ambas condiciones se observó un aumento en los niveles de expresión relativa como se mencionó en el punto 6.3.7 (Tabla XL y XLI).

En el caso del gen *PEP4*, se encontraron diferencias significativas en el cultivo CM al comparar el tiempo de 47 h con el inicio de la etapa de inducción ($P \leq 0.05$), en el cual se observó un aumento en el nivel de expresión relativa de 1.8 (Tabla XL). En el cultivo CP se encontraron diferencias significativas en todos los tiempos de inducción evaluados ($P \leq 0.01$), los cuales presentaron niveles de expresión muy bajos de 0.02 a las 22 h, 0.03 a las 30 h y 0.02 a las 47 y 68 h (Tabla XLI).

Para el gen *PRCI*, no se encontraron diferencias significativas al comparar los tiempos de inducción con el inicio de la etapa de inducción con metanol en el cultivo CM, mientras que para el cultivo CP sí se encontraron diferencias significativas en la comparación de los tiempos de 30 y 47 h con el inicio de la etapa de inducción ($P \leq 0.01$), en estos tiempos se observaron niveles relativos de expresión de 0.4 a las 30 h y 0.2 a las 47 h (Tabla XLI).

Para el gen *PRBI*, se encontraron diferencias significativas al comparar los tiempos de inducción con el inicio de la etapa de inducción con metanol en el cultivo CM a las 22 y 47 h ($P \leq 0.05$), en estos tiempos se observó un aumento en los niveles de expresión relativa de 1.4 a las 22 h y 1.8 a las 47 h (Tabla LIX). En el cultivo CP se

encontraron diferencias significativas al comparar en el tiempo de 47 h con el inicio de la etapa de inducción ($P \leq 0.05$) en la cual se observó un nivel de expresión relativa de 0.4 (Tabla XLI).

Para el gen *KAR2* la comparación de los tiempos de inducción con el inicio de la etapa de inducción presentó diferencias estadísticamente significativas en el cultivo CM a las 30 h ($P \leq 0.05$), en este tiempo se observó un aumento en el nivel de expresión relativa de 6.9 (Tabla XL). En el cultivo CP no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos evaluados (Tabla XLI).

Por último, para el gen *FTEII* solo se encontraron diferencias significativas en el cultivo CP al comparar el tiempo de 47 h con el inicio de la etapa de inducción ($P \leq 0.05$), en este tiempo se observó un aumento en el nivel de expresión relativa de 14.2 (Tabla XLI).

Tabla XL

Diferencias significativas obtenidas de la comparación de la expresión relativa de muestras obtenidas a diferentes tiempos de inducción respecto al inicio de la inducción del cultivo CM.

Tiempo (h)	CM						
	<i>KEX2</i>	<i>AOX2</i>	<i>PEP4</i>	<i>PRC1</i>	<i>PRB1</i>	<i>KAR2</i>	<i>FTEII</i>
0 y 22	*					*	
0 y 30							*
0 y 47	*		*			**	
0 y 68							

* $P \leq 0.05$

** $P \leq 0.01$

Tabla XLI

Diferencias significativas obtenidas de la comparación de la expresión relativa de muestras obtenidas a diferentes tiempos de inducción respecto al inicio de la inducción del cultivo CP.

Tiempo (h)	CP						
	<i>KEX2</i>	<i>AOX2</i>	<i>PEP4</i>	<i>PRC1</i>	<i>PRB1</i>	<i>KAR2</i>	<i>FTEII</i>
0 y 22			**				
0 y 30			**	**			
0 y 47			**	*	*		**
0 y 68		*	**	*			

* $P \leq 0.05$

** $P \leq 0.01$

6.3.9 Comparación de los niveles de expresión relativa en las dos condiciones de cultivo

Los niveles de expresión del gen *KEX2* a lo largo de las dos condiciones de cultivo se muestran en la Fig. 41. En el cultivo CM los niveles de expresión a las 30 h fueron tres veces mayores y a las 47 h fueron 4 veces mayores que en el cultivo CP, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las dos condiciones a las 30 y 47 h ($P \leq 0.05$).

Los niveles de expresión del gen *AOX2* a lo largo de las dos condiciones de cultivo se muestran en la Fig. 42. Se encontró un comportamiento similar en los niveles de expresión relativa en ambas condiciones de cultivo, sin diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos de inducción evaluados.

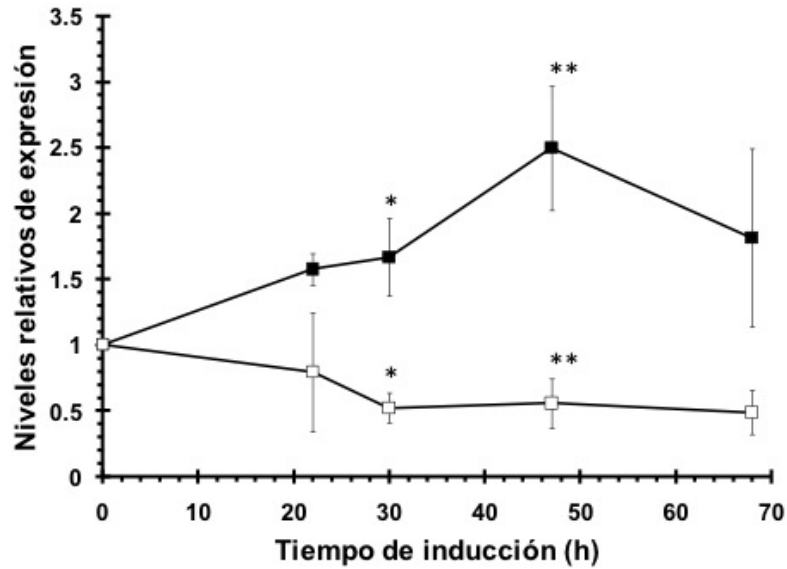


Figura 41. Comparación de los niveles de expresión relativa del gen *KEX2* en las dos condiciones de cultivo evaluadas. Cada punto corresponde al promedio de tres experimentos independientes y las barras de error corresponden al error estándar de la media. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ■ Cultivo CM, □ Cultivo CP.

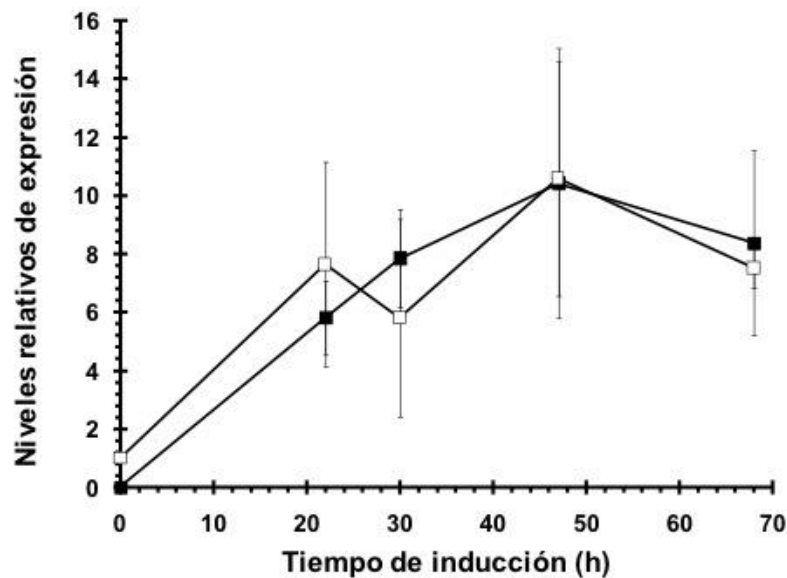


Figura 42. Comparación de los niveles de expresión relativa del gen *AOX2* en las dos condiciones de cultivo evaluadas. Cada punto corresponde al promedio de tres experimentos independientes y las barras de error corresponden al error estándar de la media. ■ Cultivo CM, □ Cultivo CP.

Los niveles de expresión del gen *PEP4* a lo largo de las dos condiciones de cultivo se muestran en la Fig. 43. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos cultivos en prácticamente toda la etapa de inducción ($P \leq 0.05$), presentándose valores de expresión que oscilaron entre 1.1 y 1.9 para el cultivo CM y de 0.02 y 0.03 para el cultivo CP.

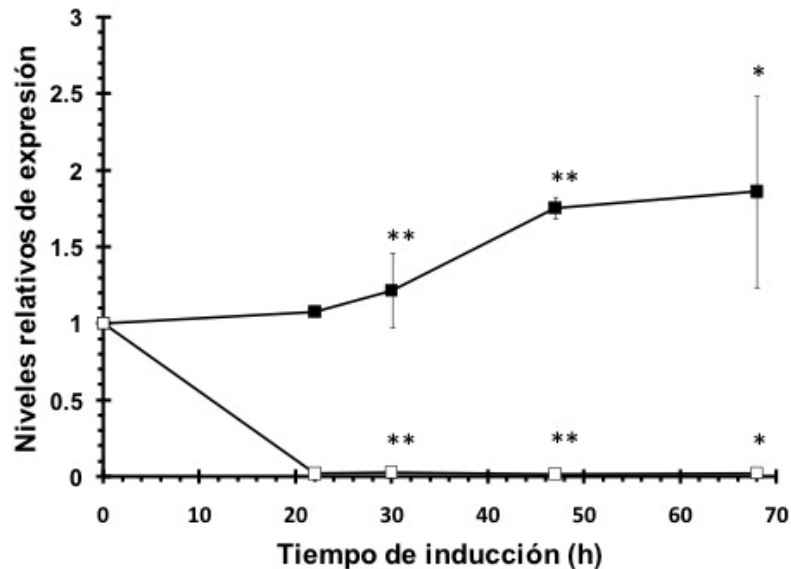


Figura 43. Comparación de los niveles de expresión relativa del gen *PEP4* en las dos condiciones de cultivo evaluadas. Cada punto corresponde al promedio de tres experimentos independientes y las barras de error corresponden al error estándar de la media. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ■ Cultivo CM, □ Cultivo CP.

Los niveles de expresión para el gen *PRC1* a lo largo de las dos condiciones de cultivo se muestran en la Fig. 44. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos condiciones de cultivo a las 30 y 47 h ($P \leq 0.05$). A las 30 h se encontraron niveles de expresión tres veces mayores en el cultivo CM que en CP con valores de 0.9 en el cultivo CM y 0.3 en el cultivo CP, mientras que a las 47 h se encontraron niveles de expresión de 1.0 en el cultivo CM y 0.2 en el cultivo CP.

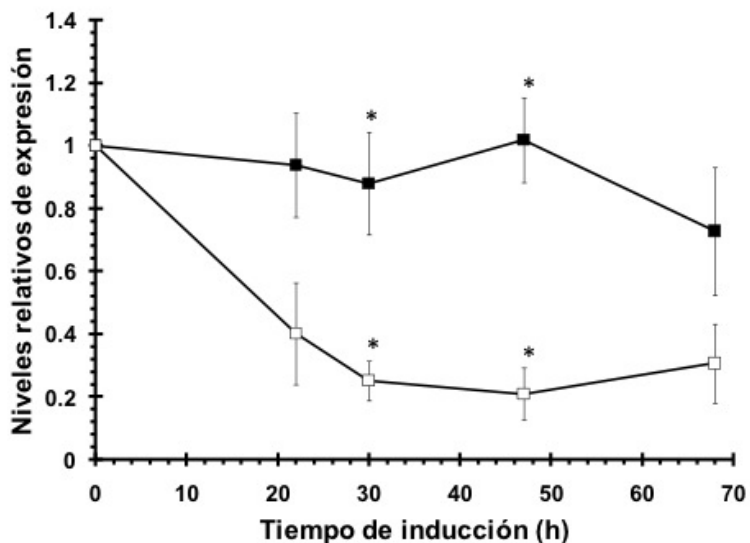


Figura 44. Comparación de los niveles de expresión relativa del gen *PRC1* en las dos condiciones de cultivo evaluadas. Cada punto corresponde al promedio de tres experimentos independientes y las barras de error corresponden al error estándar de la media. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ■ Cultivo CM, □ Cultivo CP.

Los niveles de expresión para el gen *PRB1* en la comparación de las dos condiciones de cultivo se muestran en la Fig. 45. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas a las 30 y 47 h de inducción ($P \leq 0.05$). A las 30 h se presentaron niveles de expresión relativa de 1.7 en el cultivo CM y 0.4 en el cultivo CP, mientras que a las 47 h se encontraron niveles de 0.8 en el cultivo CM y 0.4 en el cultivo CP.

Los niveles de expresión del gen *KAR2* en las dos condiciones de cultivo se pueden observar en la Fig. 46. Se encontraron diferencias significativas en todos los tiempos evaluados con niveles menores a 0.05. En el cultivo CM los niveles de expresión relativa fueron 15 veces mayores a las 22 h que en el cultivo CP con valores de 9.5 en el cultivo CM y de 0.6 en el cultivo CP. A las 30 h encontramos niveles de expresión de 6.9 en CM y 0.7 en CP, a las 47 h los niveles de expresión relativa fueron 9 veces mayores en el cultivo CM que en el cultivo CP con valores de 9.9 en el cultivo CM y 1.1 en el cultivo CP. A las 68 h encontramos nuevamente una diferencia de 9 veces entre los cultivos con valores de 9.8 en el cultivo CM y 1.2 en el cultivo CP.

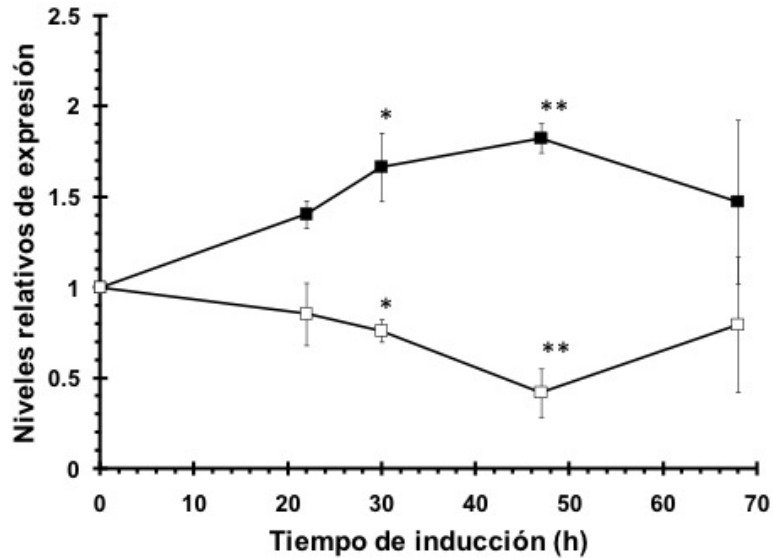


Figura 45. Comparación de los niveles de expresión relativa del gen *PRB1* en las dos condiciones de cultivo evaluadas. Cada punto corresponde al promedio de tres experimentos independientes y las barras de error corresponden al error estándar de la media. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ■ Cultivo CM, □ Cultivo CP.

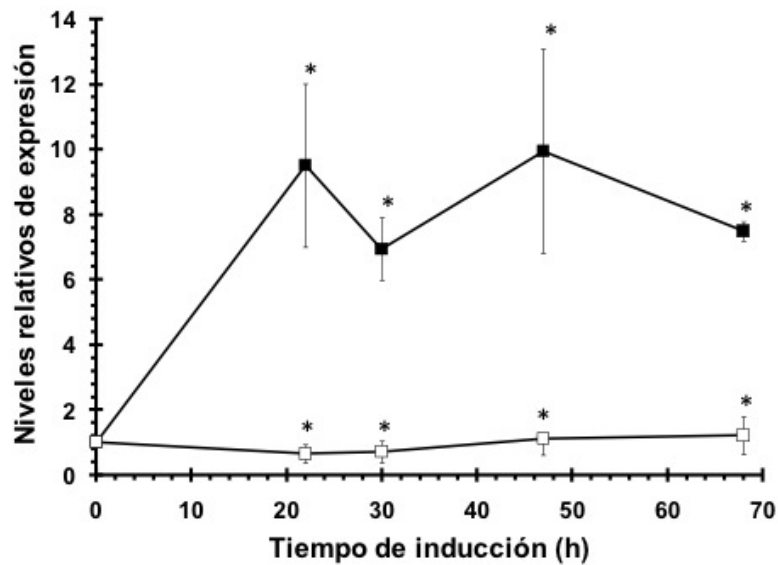


Figura 46. Comparación de los niveles de expresión relativa del gen *KAR2* en las dos condiciones de cultivo evaluadas. Cada punto corresponde al promedio de tres experimentos independientes y las barras de error corresponden al error estándar de la media. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ■ Cultivo CM, □ Cultivo CP.

Por último, los niveles de expresión del gen *FTEII* en la comparación de las dos condiciones de cultivo se muestran en la Figura 47. Se encontró un comportamiento similar en los niveles de expresión relativa en ambas condiciones de cultivo, sin diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos de inducción evaluados.

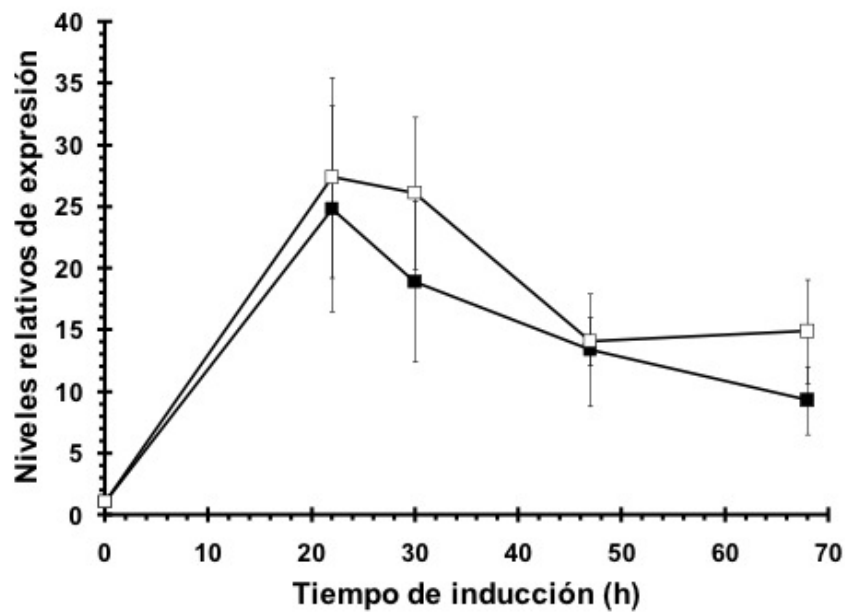


Figura 47. Comparación de los niveles de expresión relativa del gen *FTEII* en las dos condiciones de cultivo evaluadas. Cada punto corresponde al promedio de tres experimentos independientes y las barras de error corresponden al error estándar de la media. ■ Cultivo CM, □ Cultivo CP.

6.4 Correlación de la expresión de genes con la respuesta fisiológica del hospedero

6.4.1 Correlación de la expresión del gen *FTEII* con la producción de fitasa extracelular, porcentaje de secreción de fitasa y producción total de fitasa

Los niveles de expresión del gen *FTEII* durante la etapa de inducción en las dos condiciones de cultivo evaluadas fueron similares (Fig. 48A) y no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos cultivos, presentando un rápido incremento a las 22 h de inducción a valores próximos a 31 y una disminución gradual hasta valores de 17. Por otro lado, la producción de fitasa extracelular (Fig. 48B) en las dos condiciones de cultivo evaluadas mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos cultivos, alcanzando valores a las 68 h de inducción de 390,440 y 69,935 U totales para el cultivo de alta y baja producción de fitasa extracelular, respectivamente. El porcentaje de secreción de fitasa (Fig. 48C) en las dos condiciones de cultivo evaluadas también mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos cultivos, alcanzando valores a las 68 h de inducción de 87.4 y 56.3% para el cultivo de alta y baja producción de fitasa extracelular, respectivamente. La producción total de fitasa (Fig. 48D), calculada como la suma de la cantidad de fitasa intra y extracelular determinada por el método de ELISA, en las dos condiciones de cultivo evaluadas también mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos cultivos, alcanzando valores a las 68 h de inducción de 399,864 y 65,770 U totales para el cultivo de alta y baja producción de fitasa extracelular, respectivamente. Un valor 6.1 veces mayor para el cultivo de alta producción de fitasa extracelular.

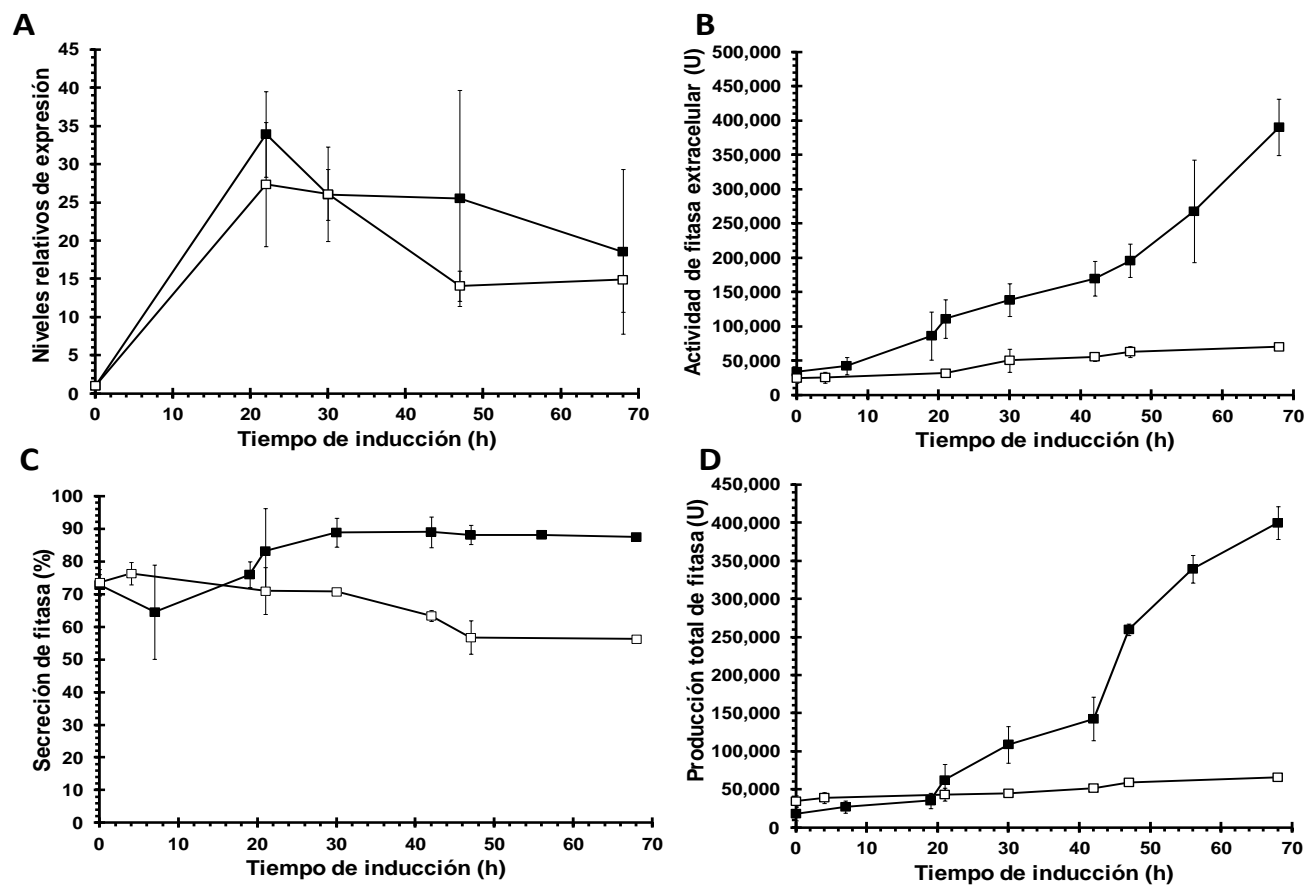


Figura 48. Niveles de expresión del gen *FTEII* (A), producción de fitasa extracelular (B), porcentaje de secreción de fitasa (C) y producción total de fitasa (D) durante la etapa de inducción de los cultivos a condiciones de alta producción (cuadros llenos) y baja producción (cuadros vacíos) de fitasa extracelular. Cada punto representa la media de tres cultivos independientes y las barras de error muestran el error estándar de la media. Los valores experimentales usados para el cálculo correspondientes a B,C y D se muestran en el anexo III.

6.4.2 Correlación de la expresión del gen *AOX2* con el crecimiento celular, consumo de metanol y producción de fitasa extracelular

Los niveles de expresión del gen *AOX2* (Fig. 49A) en las dos condiciones de cultivo evaluadas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos cultivos en la etapa de inducción, a pesar que el metanol es inductor del gen *AOX2* y que el cultivo de baja producción se realizó a una concentración de metanol constante de 0.5 g/L y en el de alta producción a 1.5 g/L de metanol. Por otro lado, se observaron diferencias significativas del crecimiento celular (Fig. 49B) y el consumo de metanol (Fig. 49C) en las dos condiciones de cultivo evaluadas entre los dos cultivos en la etapa de inducción. Los cultivos de alta producción de fitasa extracelular presentaron un crecimiento celular a una velocidad específica de crecimiento 0.012 h^{-1} , alcanzando valores de densidad celular a las 68 h de inducción de 118.5 g/L de peso seco, mientras que en los cultivos de baja producción de fitasa extracelular, no se observó crecimiento celular (velocidad específica de crecimiento 0.000 h^{-1}), siendo la densidad celular a las 68 de inducción de 68.75 g/L peso seco, la cual es incluso menor que la densidad celular inicial de estos cultivos (89.7 g/L peso seco).

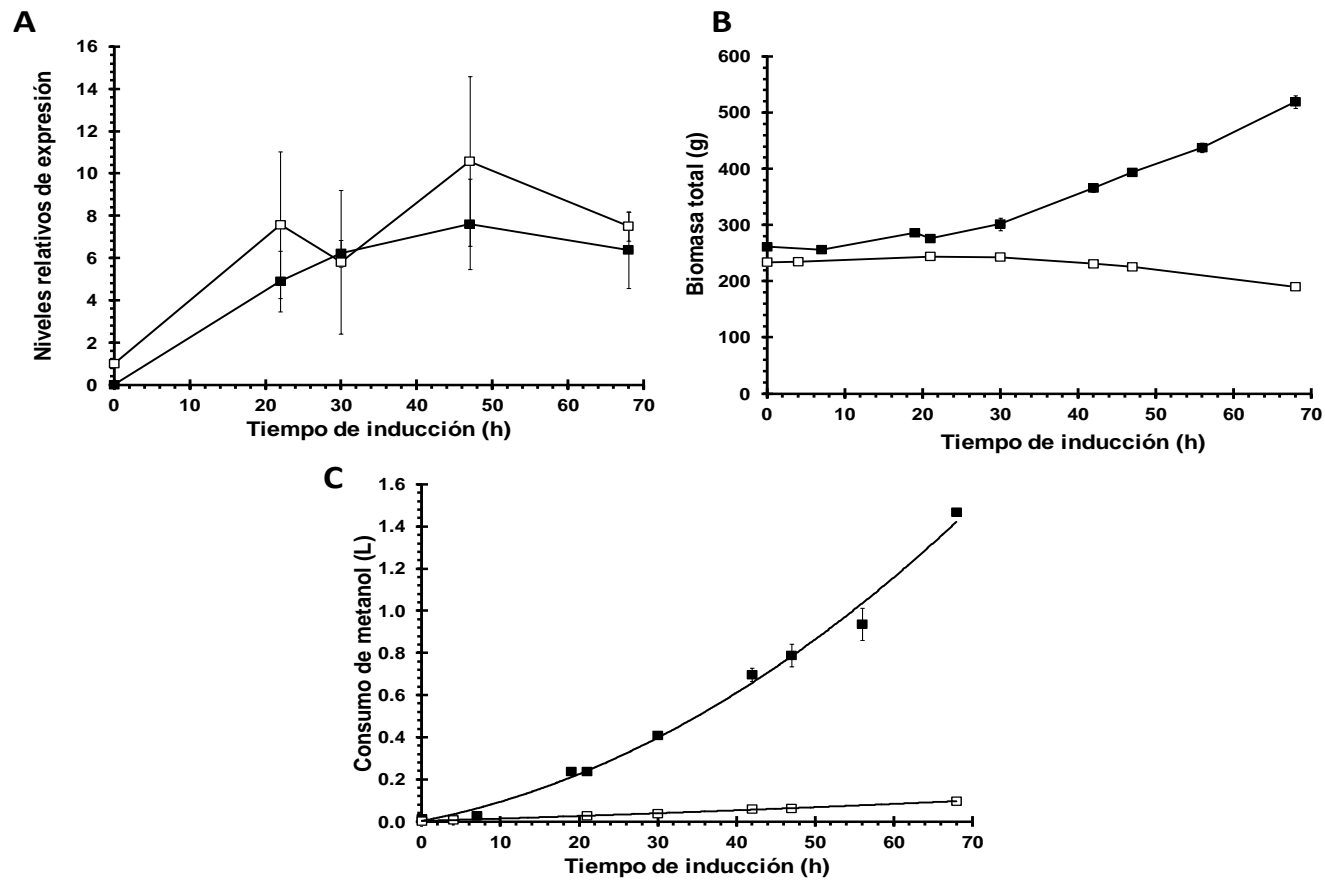


Figura 49. Niveles de expresión de los genes *AOX2* (A), crecimiento celular en peso seco (B) y consumo de metanol (C) durante la etapa de inducción de los cultivos a condiciones de alta (cuadros llenos) y baja producción (cuadros vacíos) de fitasa extracelular. Cada punto representa la media de tres cultivos independientes y las barras de error muestran el error estándar de la media. Los valores experimentales usados para el cálculo correspondientes a C y D se muestran en el anexo III.

6.4.3 Correlación de la expresión de los genes *PEP4*, *PRC1* y *PRB1* con la actividad de proteasas extracelulares y producción de fitasa extracelular

Los niveles de expresión de los genes *PEP4* (Fig. 50A), *PRC1* (Fig. 50B) y *PRB1* (Fig. 50C) en las dos condiciones de cultivo evaluadas también mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos cultivos en prácticamente toda la etapa de inducción. A las 68 h de inducción no se observaron diferencias significativas de los niveles de expresión de *PRC1* y *PRB1*. Por otro lado, la actividad extracelular de proteasas durante la etapa de inducción (Fig. 50D) fue siempre mayor en los cultivos de baja que en los de alta producción de fitasa extracelular, mostrando un valor 6 veces mayor.

6.4.4 Correlación de la expresión de los genes *KEX2* y *KAR2* con la producción de fitasa extracelular

Los niveles de expresión de los genes *KEX2* (Fig. 51A) y *KAR2* (Fig. 51B) en las dos condiciones de cultivo evaluadas también mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos cultivos en la etapa de inducción, siendo siempre mayor en los cultivos de alta que en los de baja producción de fitasa extracelular. La expresión de *KEX2* a las 68 h de inducción fue 3 veces mayor en el cultivo de alta que en el de baja producción de fitasa extracelular. La expresión de *KAR2* a las 68 h de inducción fue 10 veces mayor en el cultivo de alta que en el de baja producción de fitasa extracelular, lo cual mostró ser la mayor diferencia entre los niveles de expresión de los genes evaluados a las dos condiciones de cultivo de alta y baja producción de fitasa extracelular.

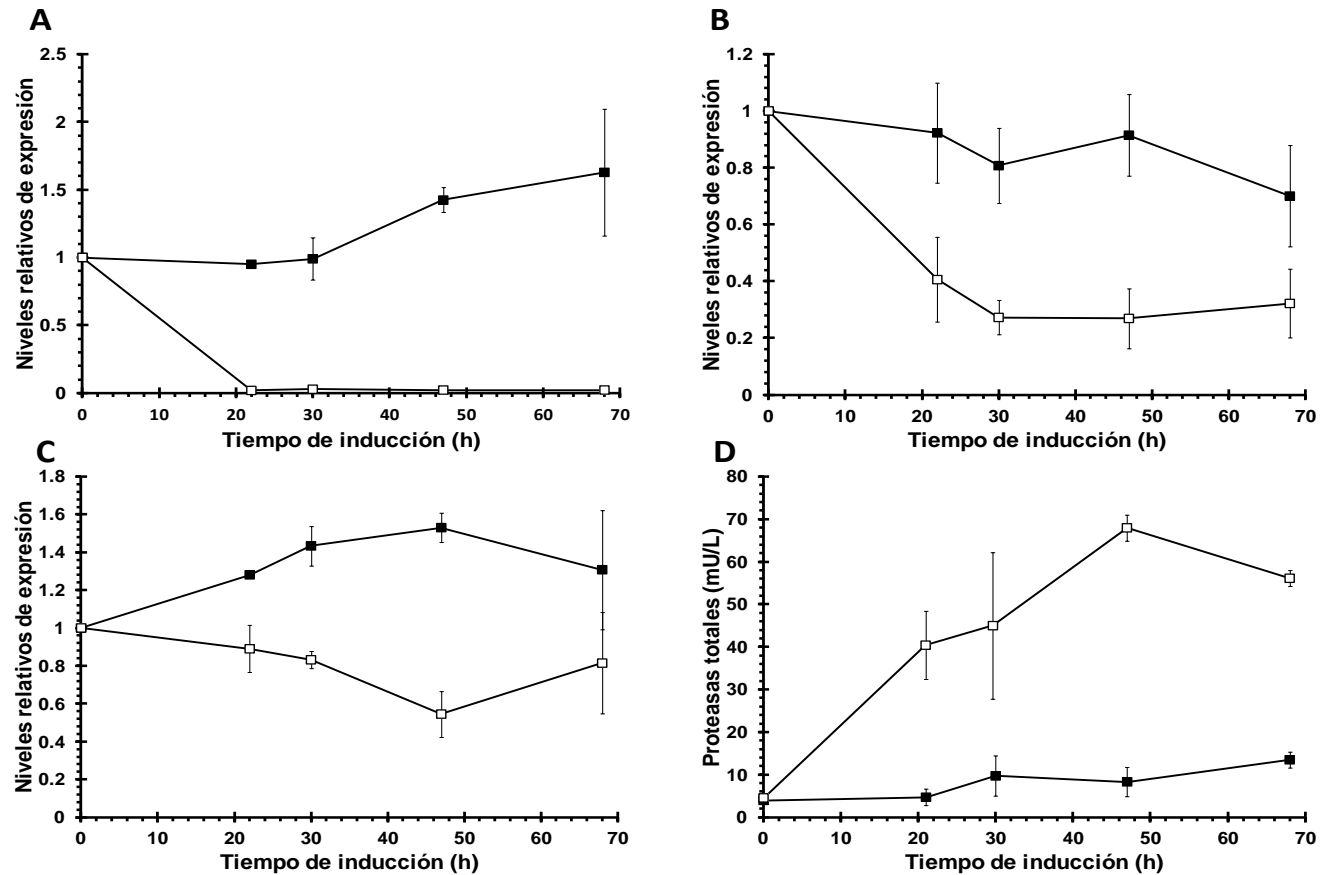


Figura 50. Niveles de expresión de los genes *PEP4* (A), *PRC1* (B) y *PRB1* (C), y actividad de proteasas extracelulares (D) durante la etapa de inducción de los cultivos a condiciones de alta (cuadros llenos) y baja producción (cuadros vacíos) de fitasa extracelular. Cada punto representa la media de tres cultivos independientes y las barras de error muestran el error estándar de la media. Los valores experimentales usados para el cálculo correspondientes a B,C y D se muestran en el anexo III.

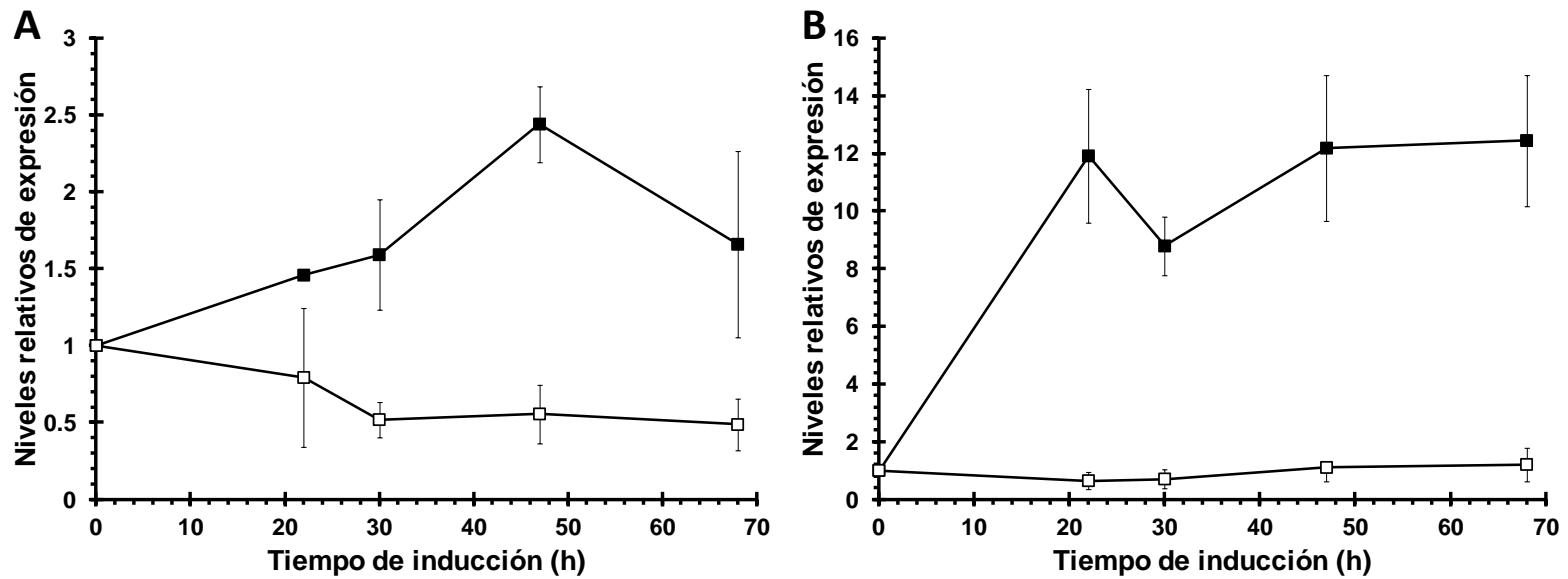


Figura 51. Niveles de expresión de los genes *KEX2* (A) y *KAR2* (B) durante la etapa de inducción de los cultivos a condiciones de alta (cuadros llenos) y baja producción (cuadros vacíos) de fitasa extracelular. Cada punto representa la media de tres cultivos independientes y las barras de error muestran el error estándar de la media.

7 DISCUSIÓN

Recientemente, nuestro grupo de trabajo describió la clonación y la expresión del gen nativo *phyC* de *Bacillus subtilis* codificante para una fitasa tipo β -propeller utilizando a *P. pastoris* como hospedero (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010). Posteriormente, se logró el diseño de nuevas fitasas β -propeller y su clonación en *P. pastoris* para su producción (Viader-Salvadó *et al.*, 2010). Basado en su actividad a distintos valores de pH, incluyendo el neutro, estas fitasas presentan potencial para uso como aditivos en alimentos de animales con tractos digestivos funcionales a valores de pH neutro-alcalino, así como también pueden ser usadas para el pre-tratamiento de dietas animales derivadas de granos vegetales. La fitasa llamada FTEII es de particular interés debido a que muestra una mayor termo-estabilidad, comparada con la de la enzima nativa PhyC, la cual es una propiedad importante de las fitasas, debido a que les permite resistir las altas temperaturas presentes en el proceso del pelletizado en la elaboración de piensos.

Previamente, se evaluó la producción de la fitasa FTEII en cultivo de matraz agitado (Viader-Salvadó *et al.*, 2010), durante el presente trabajo se buscó optimizar la producción de fitasa FTEII en cultivos en biorreactor de 5L, modificando las condiciones de cultivo. Además se evaluó la respuesta fisiológica del hospedero incluyendo la evaluación de la expresión de genes involucrados en la secreción de proteínas y metabolismo de metanol.

Así también, anteriormente, nuestro grupo de trabajo optimizó la producción en biorreactor de 5 L de la fitasa nativa PhyC producida en *P. pastoris*, modificando los valores de tres parámetros en las condiciones de cultivo (temperatura, concentración de metanol en el medio de cultivo y biomasa al inicio de la inducción), utilizando un enfoque de optimización tradicional, esto es, variando un parámetro por cada experimento y manteniendo el resto constantes para determinar la influencia de ese solo

parámetro en la producción de fitasa extracelular (Castillo Galván 2008, Viader-Salvadó *et al.*, 2013). Sin embargo, esta metodología mostró ser ineficiente respecto al consumo de tiempo y la cantidad de experimentos que se tendrían que llevar a cabo para encontrar mejoras significativas en la producción. Por lo tanto, para el presente trabajo, se utilizó un enfoque de diseño de experimentos (Método Simplex), basado en un diseño factorial fraccionado que considera la influencia de varios parámetros en las condiciones de cultivo y sus interacciones durante la etapa de inducción para aumentar la producción de la fitasa FTEII en *P. pastoris*. Previamente en nuestro grupo de trabajo se ha utilizado este enfoque para incrementar la producción de hormona de crecimiento humana (HGH) recombinante en *P. pastoris* (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2002, Guerrero-Olazarán *et al.*, 2001), para determinar la mezcla de cationes óptima de un medio de cultivo que produjeron la mayor formación de quistes de *Entamoeba histolytica* bajo condiciones axénicas (Campos-Gongora *et al.*, 2000) y para desarrollar un método AFLP que genotificara distintos asilamientos de *Mycobacterium tuberculosis* (Viader-Salvadó *et al.*, 2009). El enfoque de diseño experimental ha mostrado ser muy útil para optimizar simultáneamente, una combinación de distintos factores experimentales basado en un solo factor respuesta, lo cual reduce el número de experimentos necesarios para la evaluación de estos parámetros (Anthony, 2003). A pesar de que este enfoque ha sido ya descrito previamente para la optimización de bioprocesos (Mandenius *et al.*, 2008), en el caso de *P. pastoris*, se han hecho pocos estudios usando una estrategia de este tipo. Utilizando un método de respuesta de superficie se optimizaron la composición del medio de cultivo, así como las condiciones de cultivo para aumentar la producción de biomasa y glicerol quinasa en una cepa Mut⁺ de *P. pastoris*, lo que condujo a un incremento de 1.17 veces en la producción de la proteína recombinante en cultivos de matraz agitado (Aizemberg *et al.*, 2011). Adicional a lo anterior, se optimizó el rendimiento proteína-biomasa en función de la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto, o tres fuentes de nitrógeno distintas, usando un método de superficie de respuesta o un diseño factorial para la producción de proteína verde fluorescente, eritropoyetina y glicoproteína cisteína C en cepas recombinantes de *P. pastoris* (Holmes *et al.*, 2009, Bora *et al.*, 2012, Pritchett *et al.*, 2004).

En el presente trabajo, el proceso de optimización mostró que tres de los parámetros (densidad celular inicial, concentración de metanol en el medio de cultivo y pH en la etapa de inducción) tuvieron una tendencia a presentar un efecto directamente proporcional en la producción extracelular de fitasa, mientras que la temperatura en la etapa de inducción tuvo un efecto inversamente proporcional, y la adición de sorbitol (bajo las condiciones experimentales propuestas) no afectó significativamente la producción de fitasa extracelular. Sin embargo, reportes indican que la alimentación mixta sorbitol/metanol ayuda a disminuir el estrés metabólico causado por la sobreproducción de la proteína heteróloga en cepas Mut^s de cultivos crecidos a 30°C durante la etapa de inducción (Ramón *et al.*, 2007). Puede ser que el efecto del sorbitol no fue detectado, debido a que todos los cultivos que presentaron una producción alta de fitasa extracelular fueron crecidos a temperaturas menores a 30°C, así que el efecto de la temperatura, pudo haber enmascarado el efecto del sorbitol para los presentes ensayos. En los experimentos presentados en este trabajo, la disminución de la temperatura en la etapa de inducción llevó a un incremento en la actividad metabólica de las células, demostrado por el incremento de la demanda de oxígeno y el consumo de metanol, lo cual, incrementó la velocidad específica de crecimiento. La disminución de la temperatura también condujo a disminuir el estrés metabólico.

El método Simplex Secuencial Básico condujo a unas condiciones de cultivo que fueron una combinación de valores de cinco parámetros optimizados. Estos valores fueron iguales a los valores máximos o mínimos que afectan directa o inversamente proporcional la producción de fitasa extracelular. Esto muestra claramente la importancia de llevar a cabo un método de optimización simultánea multivariada del proceso, en vez de usar métodos de optimización tradicionales.

A pesar de que las condiciones para el cultivo A fueron deducidas utilizando el método de optimización Simplex, este cultivo tuvo la menor producción de fitasa extracelular. Esto probablemente se debió a que el cultivo se llevó a cabo a un pH de 7, el cual corresponde al límite máximo recomendado para cultivar a *P. pastoris* (Sreekrishna, 2010). Así también se ha descrito previamente la disminución del crecimiento celular cuando *P. pastoris* se cultiva a pH 7 o por encima (Holmes *et al.*, 2009).

La estrategia de alimentación de metanol es crucial para maximizar la producción de proteínas en *P. pastoris*. Debido a que en el presente trabajo se utilizó un sistema de “close loop” para monitorear y controlar la concentración de metanol en el cultivo, se logró mantener una concentración de metanol constante para todos los cultivos, durante la etapa de inducción. Este tipo de estrategia ha sido reportada previamente como benéfica para una producción óptima de proteínas (Sreekrishna, 2010; Damasceno *et al.*, 2004). Una estrategia de alimentación tipo “ON/OFF” (añadir y dejar de añadir metanol para mantener la concentración de metanol) ha sido reportada como inadecuada para el control preciso de la concentración de metanol en el biorreactor (Sreekrishna; 2010, Cos *et al.*, 2006). Lo observado en el presente trabajo, confirma que para cepas tipo Mut^s no es el caso, ya que una simple estrategia “ON/OFF” acoplada a una alimentación de metanol de “close loop” fue suficiente para mantener constante la concentración de metanol en el medio de cultivo, fluctuando solo 1% en las mediciones hechas en línea por el sensor de metanol, respecto el valor deseado para todos los cultivos. Otra estrategia de alimentación de metanol que es comúnmente usada por algunos autores es la alimentación exponencial con metanol, también llamada estrategia de metanol limitado en cultivo en lote (Barrigón *et al.*, 2013), la cual proporciona una velocidad específica de crecimiento constante para mantener un crecimiento limitado (Zhang *et al.*, 2000; Trinh *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2003), sin embargo estos estudios se llevaron a cabo con cepas Mut⁺. Para cepas Mut^s, una estrategia de este tipo ha sido descrita, usando además alimentación mixta de glicerol o sorbitol con metanol (Ramón *et al.*, 2007; d’Anjou *et al.*, 200Ñ, d’Anjou *et al.*, 1997). En el presente trabajo utilizando una cepa Mut^s, las células demandaron metanol tal como lo requirieron según su metabolismo, y simultáneamente se mantuvo una concentración de metanol constante en el medio de cultivo. Con esta estrategia de alimentación automatizada, el metanol se añadió siguiendo un comportamiento de ecuación polinomial de segundo orden que generó un crecimiento exponencial con una μ constante en todos los cultivos (entre 0.000 y 0.013 h⁻¹). Anteriormente nuestro grupo de trabajo ha descrito un sistema automatizado de alimentación de metanol con un comportamiento polinomial de segundo orden (Viader-Salvadó *et al.*, 2013), el cual ha sido también descrito en la literatura (Huang *et al.*, 2011). Una estrategia de alimentación de metanol no limitado

fue recientemente comparada con la estrategia de adición de metanol limitada en un cultivo en lote alimentado en cepas tipo Mut⁺ (Barrigón *et al.*, 2013). Estos autores reportaron producción de proteína extracelular y un valor de Y_{p/x} más alto cuando los cultivos se hicieron con la estrategia de alimentación de metanol no limitado. Nuestro sistema automatizado de alimentación proporcionó metanol a un flujo de hasta 0.68 mL/min (14 mL/L/h), el cual es 2.3 veces mayor que el flujo de metanol tradicionalmente recomendado para cepas Mut^s (Stratton *et al.*, 1998). La disminución de la temperatura en la etapa de inducción fue a su vez, un parámetro que influyó para que las células presentaran una alta demanda de metanol, mientras que la temperatura de 30°C en la etapa de inducción resultó en velocidades de alimentación de metanol similares a los recomendados. El índice de consumo de sustrato (q_s) ha sido relacionado con la productividad de *P. pastoris*, y ha sido recomendado para el control de bioprocesos con cepas Mut^s (Dietzsch *et al.*, 2011). Durante el presente trabajo se han obtenido resultados similares a los descritos previamente en esta literatura, donde la producción extracelular de fitasa se incrementó respecto al incremento de los valores de q_s, sin embargo, los valores de q_s reportados a las 68 h de inducción, en nuestros experimentos (0.1-1.2 mmol/g/h) fueron menores que los descritos en la literatura (Dietzsch *et al.*, 2011) para la productividad máxima específica.

Aunque, las cepas Mut^s consumen menos oxígeno que las cepas Mut⁺, en cuatro de los cultivos (G, H, I y J) se necesitó administrar mezclas de aire/oxígeno para mantener el oxígeno disuelto a valores mayores del 20%, y simultáneamente mantener constante la concentración de metanol. Para estos cuatro cultivos, esta adición de oxígeno fue necesaria cuando las células alcanzaron una densidad celular próxima a los 100 g/L de peso seco (400 g/L peso húmedo).

Gracias al proceso de optimización Simplex se obtuvieron hasta 347,682 U totales a las 68 horas de inducción, que corresponde a 82,814 U/L y 6.4 g/L de la proteína recombinante en el medio de cultivo equivalente a 146,100 U/L y 11.2 g/L en el medio de cultivo libre de células. Este nivel en la producción de fitasa fue 11 veces mayor que el obtenido para el cultivo con la producción más baja de FTEII, 13 veces mayor que el cultivo de mayor producción en bioreactor para la cepa KM71phyC (Castillo Galván, 2006, Viader-Salvadó *et al.*, 2013) y 3,500 veces mayor que el nivel

reportado en matraz agitado (Viader-Salvadó et al., 2010) correspondiendo con valores de $Y_{p/x}$ de 4, 12 y 3 veces mayores respectivamente. Adicionalmente, el máximo nivel de producción reportado en este trabajo equivale a 1.75 veces más que lo reportado previamente para la fitasa de *E. coli* producida en cepas Mut^s de *P. pastoris* en cultivos de biorreactor de 5 L (Chen et al., 2004) (11.2 vs 6.4 g/L en el medio de cultivo libre de células). Es también un valor máximo muy cercano a aquellos normalmente obtenidos en cultivos en bioreactor de *P. pastoris* (Cereghino et al., 2002)) (de 1 mg a 10 g de proteína recombinante por litro de medio de cultivo). El cultivo de FTEII se detuvo a las 68 h en el cultivo J que fue el de mayor producción debido a que el vaso del biorreactor con capacidad de 5 L se llenó a consecuencia de la alta cantidad de metanol añadido, esto a pesar de que la producción extracelular de fitasa se seguía incrementando. Por esto, trabajando con un biorreactor de mayor capacidad, se esperaría incrementar los niveles de producción total, pese a que la productividad del proceso (producto sobre tiempo de proceso) tendría que ser verificada en el escalamiento.

Los resultados obtenidos durante el proceso de optimización indican que el aumento de la producción se correlacionó con un incremento en la actividad metabólica de *P. pastoris*, mostrando también un incremento en la velocidad específica de crecimiento, con un valor óptimo entre 0.013 h⁻¹-0.017-h⁻¹. Esta velocidad específica de crecimiento es mayor que la reportada por otros autores para cepas Mut^s con una estrategia similar de alimentación de metanol (Cos et al., 2006), aun así, este valor es lejano a la velocidad específica de crecimiento característica para cepas Mut^s (0.035 h⁻¹) (Stratton et al., 1998 Brierley et al., 1990). Además, se logró un incremento de la producción de fitasa extracelular junto a una disminución de la actividad de proteasas en el medio de cultivo libre de células, así fuese por una disminución en la lisis celular del cultivo o por baja actividad de estas proteasas en las condiciones experimentales. Por otra parte, las condiciones óptimas de cultivo encontradas por el proceso de optimización incrementaron la eficiencia en la secreción de la proteína recombinante hasta un 88%. El incremento de $Y_{p/x}$ durante el proceso de optimización indica que el incremento en la producción de fitasa extracelular se debió a un incremento en la eficiencia en la producción fitasa extracelular por célula, dando entender además que las células usan mayoritariamente el metanol de la etapa de inducción en la generación de

energía y que solo una parte del metabolismo de ese metanol se dirige a la producción de biomasa. Por lo tanto, no se encontró una correlación directa entre la densidad celular y la producción de proteínas en estos cultivos. El cultivo F, fue el único cultivo que presentó una disminución en el valor de $Y_{p/x}$ con respecto a su predecesor, mostrado en la figura 6.8 (sección 6.1). Este hallazgo, indica que el cultivo F disminuyó la relación entre la generación la genergía y producción de biomasa durante la etapa de inducción, comparado con el cultivo E. Sin embargo, el oxígeno disuelto en el tanque, del cultivo F, decayó a las 50 h de inducción, y no fue posible administrarle el oxígeno necesario para las células. Esto sugiere que el incremento de la eficiencia en la producción de fitasa extracelular por célula pudiera también estar relacionado a la adición de oxígeno cuando la actividad metabólica de las células se incrementa.

El presente trabajo, no solo trata con el proceso de optimización para incrementar la producción de una proteína heteróloga en *P. pastoris*, sino también contribuye a la comprensión del impacto que tienen las condiciones de cultivo sobre la respuesta fisiológica del hospedero, medida por el consumo de metanol, la velocidad específica de crecimiento, la actividad de proteasas en el medio de cultivo, el porcentaje de secreción de la fitasa FTEII, y el rendimiento producto respecto a la biomasa. A pesar de que *P. pastoris* es uno de los organismos que más frecuentemente se usan para la producción de proteínas heterólogas (Sreekrishna, 2010), estudios sobre el comportamiento fisiológico y su relación con la producción de proteínas tiene aún que ser evaluada. Por esto, adicionalmente se incluyó el estudio de la expresión diferencial de siete genes involucrados en estos procesos fisiológicos en las condiciones de cultivo de mayor y menor producción de fitasa extracelular. Estos resultados y su relación con la fisiología de *P. pastoris*, así como con la producción de fitasa extracelular se discuten a continuación.

Para el análisis de los niveles de expresión de los genes en estudio es importante realizar un diseño experimental adecuado empleando genes normalizadores, ya que es inevitable encontrar variación generada por el muestreo y conservación, preparación de muestras de RNA, síntesis de DNAc y ensayos de qPCR. Los genes normalizadores seleccionados, *YPT1* y *G6PD*, son genes de expresión constitutiva en *P. pastoris*, cuya expresión no se vio afectada por las condiciones de cultivo a las cuales fueron

sometidas, presentando niveles de expresión constantes en ambos cultivos. El uso de un gen normalizador puede llevar a resultados erróneos, por lo que se recomienda el uso de dos o más genes normalizadores para obtener resultados más confiables (Bustin *et al.*, 2002). El método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ representa el modelo matemático mayormente utilizado para la determinación de los niveles de expresión relativos (Bustin *et al.*, 2002), aunque la fórmula original no presenta correcciones de la eficiencia de amplificación, existen alteraciones de la fórmula original para incluir dichas correcciones. Debido a que en la determinación de las eficiencias de amplificación para los genes en estudio se obtuvieron valores de eficiencia próximos al 100% pero diferentes para cada gen, se realizó el cálculo de los niveles de expresión relativa empleando el método de la $2^{-\Delta\Delta CT}$ con corrección de las eficiencias de amplificación. Además, debido a que se emplearon diferentes diluciones del DNAC en los ensayos de qPCR para obtener valores de C_T que se encontraran dentro del intervalo de linealidad determinado con las curvas de eficiencias realizadas, se añadió al cálculo de los niveles de expresión la corrección de los diferentes factores de dilución empleados en cada caso.

Los niveles de expresión del gen *FTEII* durante la etapa de inducción en las dos condiciones de cultivo evaluadas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos cultivos. Estos resultados indican que el proceso de transcripción del gen *FTEII* no se vio afectado por las condiciones de cultivo ensayadas, a pesar que el cultivo de baja producción se realizó a una concentración de metanol constante de 0.5 g/L y el de alta producción a 1.5 g/L de metanol. Al ser el metanol el inductor del promotor que regula la expresión del gen *FTEII*, cabría esperar que los niveles de transcripción de este gen cambiaran con la concentración de metanol en el medio de cultivo, y no fue así al menos a las condiciones evaluadas. Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en la producción de fitasa extracelular entre los cultivos de mayor y menor producción, esto indica que la diferencia en la producción de fitasa extracelular de estos dos cultivos tiene que deberse a una diferencia en el proceso de traducción o en alguno de los procesos postraduccionales, incluyendo el proceso la secreción, o bien en la estabilidad de la fitasa recombinante en el medio de cultivo. A su vez, el porcentaje de secreción de fitasa en las dos condiciones de cultivo evaluadas también mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos cultivos. Este

resultado indica que el proceso de secreción se vio afectado por las condiciones de cultivo ensayadas, volviéndose más eficiente en las condiciones de cultivo de alta producción de fitasa. Debido a que en el cultivo de alta producción de fitasa extracelular la producción total de fitasa fue 6.1 veces mayor que en el cultivo de baja producción de fitasa extracelular, y el porcentaje de secreción de fitasa sólo fue 1.6 veces mayor en el cultivo de alta respecto al de baja producción de fitasa extracelular, es probable que la diferencia en la producción de fitasa extracelular entre estos dos cultivos sea debida principalmente a una diferencia en los procesos de traducción o de modificaciones postraduccionales.

Para los tres genes de proteasas vacuolares evaluados, *PEP4*, *PRC1* y *PRB1*, los niveles de expresión fueron mayores en el cultivo de alta que en el de baja producción de fitasa extracelular a tiempos menores de 68 horas de inducción, indicando que al menos de forma intracelular, estas proteasas son importantes para la producción de fitasa y las condiciones de cultivo influyen directamente en la expresión de estos genes. Este fenómeno fue más acentuado en *PEP4*, cuyos niveles de expresión en el cultivo de baja producción de fitasa extracelular fueron disminuyendo desde el inicio de la inducción hasta llegar a valores prácticamente nulos (0.02). Este hallazgo es importante ya que existen cepas comerciales de *P. pastoris* en teoría útiles para producir proteínas sensibles a la proteólisis que son deficientes en la proteínasa A (gen *PEP4*) o proteínasa B (gen *PRB1*), o en ambas proteasas (Invitrogen 2002; Stratton *et al.*, 1998, Cereghino & Cregg 2000). Sin embargo, al menos para la fitasa FTEII y en las condiciones evaluadas, una mayor expresión de *PEP4* y *PRB1* fue beneficiosa para una mayor producción de fitasa extracelular. Por otro lado, la actividad extracelular de proteasas durante la etapa de inducción fue siempre mayor en los cultivos de baja que en los de alta producción de fitasa extracelular. Generalmente la presencia de proteasas extracelulares en *P. pastoris* son debidas a lisis celular, por lo tanto los resultados obtenidos indican que en el cultivo de alta producción de fitasa extracelular el crecimiento celular ocurre con menor lisis celular que en el cultivo de baja producción de fitasa extracelular, o bien que las proteasas detectadas en el medio de cultivo no corresponden a las proteasas codificadas por los genes *PEP4*, *PRC1* y *PRB1*.

Los niveles de expresión del gen *AOX2* en las dos condiciones de cultivo evaluadas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos cultivos en la etapa de inducción. Esto indica que el metabolismo de metanol no está limitado por la inducción del gen *AOX2* y por lo tanto por la alcohol oxidasa 2, sino que está limitado por la propia concentración de metanol en el medio de cultivo. Al igual que los cultivos realizados durante el proceso de optimación, el consumo de metanol mostró un comportamiento polinomial de segundo orden ($R^2=0.9916$) en los cultivos a las dos condiciones evaluadas, siendo mayor en los cultivos de alta que en los de baja producción de fitasa extracelular. Los resultados del crecimiento celular y consumo de metanol parecen indicar que la diferencia en la producción de fitasa extracelular fue debida a una marcada diferencia en el crecimiento celular en las dos condiciones de cultivo evaluadas. Sin embargo un análisis de los rendimientos producto/biomasa ($Y_{p/x}$) durante el proceso de optimación demostró que el aumento en la producción de fitasa extracelular fue debida al incremento de la eficiencia en la producción de fitasa por célula, como se describió a su vez durante el proceso de optimización.

El gen *KEX2* codifica para la proteasa *KEX2* responsable del procesamiento de la región pro del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, situado de forma artificial en el extremo amino terminal de la fitasa FTEII para dirigir, junto con el péptido señal del factor alfa, la secreción de la fitasa al medio de cultivo. Las condiciones de cultivo del cultivo de alta producción de fitasa extracelular generaron una mayor expresión de *KEX2* y por lo tanto una mayor secreción de la fitasa al medio de cultivo. La expresión de *KAR2* a las 68 h de inducción fue 10 veces mayor en el cultivo de alta que en el de baja producción de fitasa extracelular, lo cual mostró ser la mayor diferencia entre los niveles de expresión de los genes evaluados a las dos condiciones de cultivo de alta y baja producción de fitasa extracelular. Esto indica que las condiciones de cultivo del cultivo de alta producción de fitasa extracelular estimularon principalmente la expresión de *KAR2* y ésta a su vez presentó el efecto más beneficioso sobre la producción de fitasa. El gen *KAR2* codifica para la chaperona BiP, proteína principal responsable del plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico. Por lo tanto, una mayor expresión de *KAR2* en los cultivos de alta producción de fitasa extracelular indica un mejor plegamiento intracelular de la proteína recombinante, lo cual ha sido reportado como un

efecto benéfico para aumentar la secreción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Por otro lado, el aumento de los niveles de la proteína BiP ha sido reportado como un marcador del aumento de estrés celular, sin embargo en los cultivos de alta producción de fitasa extracelular no se observaron indicios de mayor estrés celular que en los cultivos de baja producción de fitasa extracelular, lo cual quedaría justificado si las condiciones de cultivo de alta producción de fitasa extracelular estimularan una mayor utilización del metanol para generación de energía para el crecimiento celular, tal como lo indicó el análisis de los rendimientos producto/biomasa y rendimiento producto/sustrato durante el proceso de optimación.

Estos resultados indican que el proceso de transcripción del gen *FTEII* no se vio afectado diferencialmente por las condiciones de cultivo ensayadas y que por lo tanto el aumento de la producción de FTEII durante la optimación no es dependiente de la regulación del promotor AOX1 pero si correlaciona con un aumento de la actividad metabólica dirigida a producir energía empleada en procesos de traducción, postraducción y secreción de FETII y dirigida al menos en la expresión de los genes involucrados en la vía de secreción y proteólisis estudiados en este trabajo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Usando un método multifactorial Simplex secuencial básico, se logró determinar condiciones de cultivo que permiten producir hasta 347,682 U de FTEII (82,814 U/L ó 6,4 g/L de medio de cultivo) valores que representan una producción once veces más altos obtenidos a las condiciones de cultivo de mejor producción respecto a las condiciones de cultivo de con los niveles más bajos de producción.
- El aumento en la producción extracelular de fitasa a través del proceso de optimación se correlaciona con un aumento en la actividad metabólica de *P. pastoris*, caracterizado por un aumento en la demanda de oxígeno, el consumo de metanol y, por consecuencia incremento de la velocidad específica de crecimiento. La presencia de sorbitol no fue determinante en el aumento de la producción.
- El aumento de la producción extracelular de fitasa correlaciona también con una disminución de la actividad extracelular de proteasas, un aumento en la secreción de la proteína recombinante (con valores de hasta en un 88% de FTEII extracelular), y aumento de la eficiencia de la producción extracelular de fitasa por célula.
- El incremento de la eficiencia en la producción de fitasa por célula no fue debida a un aumento del proceso de transcripción del gen *FTEII* sino que fue debida probablemente a un aumento de la eficiencia del proceso de traducción, de procesos postraduccionales o secreción de FTEII.
- El proceso de secreción es más eficiente en las condiciones de cultivo de los cultivos de alta producción de fitasa, y correlaciona con el hecho de a que esas condiciones de cultivo se presentó una mayor expresión del gen *KEX2*. y de los genes de proteasas vacuolares (*PEP4*, *PRB1*, y *PRC1*)
- El metabolismo de metanol no estuvo limitado por la expresión del gen *AOX2* ya que los niveles de expresión de este gen no mostraron diferencias significativas a las

condiciones de cultivo de mejor producción que a las condiciones de cultivo con los niveles más bajos, sino que estuvo limitado por la propia concentración de metanol en el medio de cultivo.

- Las condiciones de cultivo de los cultivos de alta producción extracelular de fitasa estimularon la expresión de *KAR2*, y ésta a su vez presentó probablemente un efecto beneficioso sobre la producción de fitasa debido a una mejora en el plegamiento FTEII y su secreción, aunque con un costo de consumo de energía.

- Pese a que en el cultivo de baja producción (CP) hay mayor actividad de proteasas en el medio de cultivo libre de células, no hay una mayor inducción de *pep4*, *prc1* y *prb1* por parte de las levaduras. Por esto, las proteasas en el medio de cultivo podrían deberse a la lisis celular presente en estos cultivos.

- La relación del aumento en la producción con la expresión de *Kar2* propone a futuro un estudio más profundo de los genes que codifican para proteínas involucradas en plegamiento y secreción como *Pdi*, *Ero*, Calnexina.

- El aumento de la actividad metabólica de *P. pastoris* sugiere así mismo una relación con genes involucrados en la ruta de metabolismo de metanol, genes como DAS (Dihidroxi acetona sintetasa) y FLD (Formaldehído deshidrogenasa) podrían arrojar datos valiosos acerca de los cambios de la actividad metabólica.

- Otros genes a estudiar, serían aquellos involucrados en el procesamiento del péptido inmaduro, tales como los complejos SEC61 y OST así como otros genes involucrados en desórdenes de plegamiento como la respuesta a proteínas mal plegadas (gen *HacI*) y ERAD.

- La información obtenida en el presente trabajo impacta directamente en el diseño de procesos más eficientes para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*.

ANEXO I

Para realizar el cálculo de la expresión relativa de los genes en estudio, se tomó el método de la $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak *et al.*, 2001), el cual calcula la cantidad de blanco, normalizado a un control endógeno y relativo a un calibrador. Corrigiendo la fórmula de la $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para incluir en el cálculo los valores de las eficiencias de amplificación obtenidas para cada gen y los factores de dilución de los DNAc empleados en los ensayos de qPCR, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{FD_{X,q}(1 + E_X)^{-(C_{T,X,q})}}{FD_{X,cb}(1 + E_X)^{-(C_{T,X,cb})}} \div \frac{FD_{R,q}(1 + E_R)^{-(C_{T,R,q})}}{FD_{R,cb}(1 + E_R)^{-(C_{T,R,cb})}}$$

Ecuación 1. Cálculo de la expresión relativa incluyendo eficiencias de amplificación y factores de dilución.

Origen de la fórmula: La ecuación que describe la amplificación exponencial de la PCR es:

$$X_n = X_o \times (1 + E_X)^n$$

Ecuación 2. Amplificación exponencial de la PCR.

Donde:

X_n = número de moléculas blanco en el ciclo n

X_o = número inicial de moléculas blanco

E_X = eficiencia de amplificación del blanco

n= número de ciclos

El ciclo umbral (C_T) indica el numero fraccional del ciclo en el cual la cantidad de blanco amplificado alanza un umbral específico, así,

$$X_T = X_o \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X$$

Ecuación 3. Amplificación exponencial de la qPCR para las moléculas blanco.

Donde:

X_T = valor de umbral de fluorescencia de las moléculas blanco

$C_{T,X}$ = ciclo umbral de la amplificación del blanco

K_X = constante

También se realiza una ecuación similar para las moléculas empleadas como normalizadoras o de referencia:

$$R_T = R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

Ecuación 4. Amplificación exponencial de la qPCR para las moléculas de referencia.

Donde:

R_T = valor de umbral de fluorescencia para las moléculas de referencia

R_o = número inicial de moléculas de referencia

E_R = eficiencia de la amplificación de las moléculas de referencia

$C_{T,R}$ = ciclo umbral de la amplificación de las moléculas de referencia

K_R = constante

Ya que todas las muestras blanco deben ser normalizadas, se divide X_T entre R_T resultando la siguiente expresión:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_o \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$

Ecuación 5. División de la amplificación exponencial de la qPCR de las moléculas blanco (Ecuación 3) y de referencia (Ecuación 4).

Despejando:

$$X_N = \frac{X_o}{R_o} = \frac{X_T \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}}{R_T \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}} = K = \frac{(1 + E_R)^{C_{T,R}}}{(1 + E_X)^{C_{T,X}}}$$

Ecuación 6. Normalización de las moléculas blanco.

Donde:

$X_N = X_o/R_o$ = la cantidad normalizada de blanco

El siguiente paso es dividir X_N de cualquier muestra (q) por la X_N de la muestra calibradora (cb):

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{\frac{X_{o,q}}{R_{o,q}}}{\frac{X_{o,cb}}{R_{o,cb}}} = \frac{\frac{X_{T,q} \times (1 + E_R)^{C_{T,R,q}}}{R_{T,q} \times (1 + E_X)^{C_{T,X,q}}}}{\frac{X_{T,cb} \times (1 + E_R)^{C_{T,R,cb}}}{R_{T,cb} \times (1 + E_X)^{C_{T,X,cb}}}}$$

Ecuación 7. División de las moléculas blanco normalizadas entre las moléculas calibradoras normalizadas.

Dado que a un mismo umbral de fluorescencia $X_{T,q} = X_{T,cb}$, entonces:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{(1 + E_R)^{C_{T,R,q}} \times (1 + E_X)^{C_{T,X,cb}}}{(1 + E_R)^{C_{T,R,cb}} \times (1 + E_X)^{C_{T,X,q}}}$$

Ecuación 8. División de las moléculas blanco normalizadas entre las moléculas calibradoras normalizadas sin los valores de umbral de fluorescencia.

Simplificando:

$$\frac{(1 + E_X)^{-(C_{T,X,q} - C_{T,X,cb})}}{(1 + E_R)^{-(C_{T,R,q} - C_{T,R,cb})}}$$

Ecuación 9. Ecuación 8 simplificada.

Otra forma de representar la ecuación:

$$\frac{(1 + E_X)^{-(C_{T,X,q} - C_{T,X,cb})}}{(1 + E_R)^{-(C_{T,R,q} - C_{T,R,cb})}} = \frac{(1 + E_X)^{-C_{T,X,q}}}{(1 + E_X)^{-C_{T,X,cb}}} \div \frac{(1 + E_R)^{-C_{T,R,q}}}{(1 + E_R)^{-C_{T,R,cb}}}$$

Ecuación 10. Ecuación 8 simplificada.

Por último, se incluyó en la ecuación la corrección de las diferentes diluciones de los DNAC empleados para los ensayos de qPCR:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{\frac{X_{o,q}}{R_{o,q}}}{\frac{X_{o,cb}}{R_{o,cb}}} \times \frac{\frac{FD_{X,q}}{FD_{R,q}}}{\frac{FD_{X,cb}}{FD_{R,cb}}}$$

Ecuación 11. Multiplicación de la ecuación 8 por los factores de dilución empleados en los ensayos de qPCR.

Donde:

$FD_{X,q}$ = Factor de dilución de la molécula blanco en cualquier muestra

$FD_{R,q}$ = Factor de dilución de las moléculas de referencia en cualquier muestra

$FD_{X,cb}$ = Factor de dilución de la molécula blanco en la muestra calibradora

$FD_{R,cb}$ = Factor de dilución de las moléculas de referencia en la muestra calibradora

Multiplicando por lo factores de dilución:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \left[\frac{(1 + E_X)^{-C_{T,X,q}}}{(1 + E_X)^{-C_{T,X,cb}}} \div \frac{(1 + E_R)^{-C_{T,R,q}}}{(1 + E_R)^{-C_{T,R,cb}}} \right] \times \frac{FD_{X,q} \times FD_{R,cb}}{FD_{X,cb} \times FD_{R,q}}$$

Ecuación 12. Multiplicación de la ecuación 8 por los factores de dilución empleados en los ensayos de qPCR.

Resultando la ecuación para el cálculo de la expresión relativa como la programada en la plantilla de trabajo de Excel:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{FD_{X,q} (1 + E_X)^{-C_{T,X,q}}}{FD_{X,cb} (1 + E_X)^{-C_{T,X,cb}}} \div \frac{FD_{R,q} (1 + E_R)^{-C_{T,R,q}}}{FD_{R,cb} (1 + E_R)^{-C_{T,R,cb}}}$$

Ecuación 1. Cálculo de la expresión relativa incluyendo eficiencias de amplificación y factores de dilución.

ANEXO II

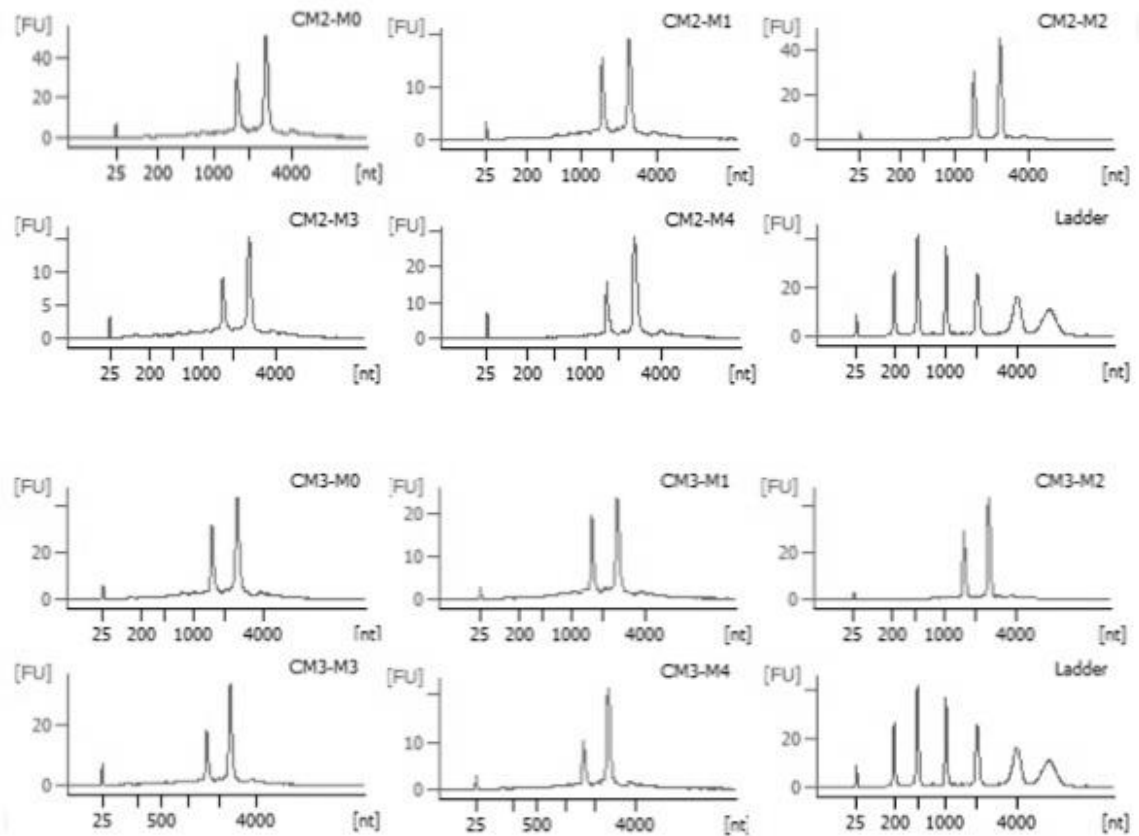


Figura 1. Electroferogramas del RNA total de los 5 tiempos de inducción de los cultivos CM2 y CM3. Los dos picos altos corresponden a los RNA ribosomales 18S y 26S, respectivamente. El último electroferograma (Ladder) corresponde al marcador empleado por el equipo bioanalizador para determinar el tamaño molecular de los picos de RNA.

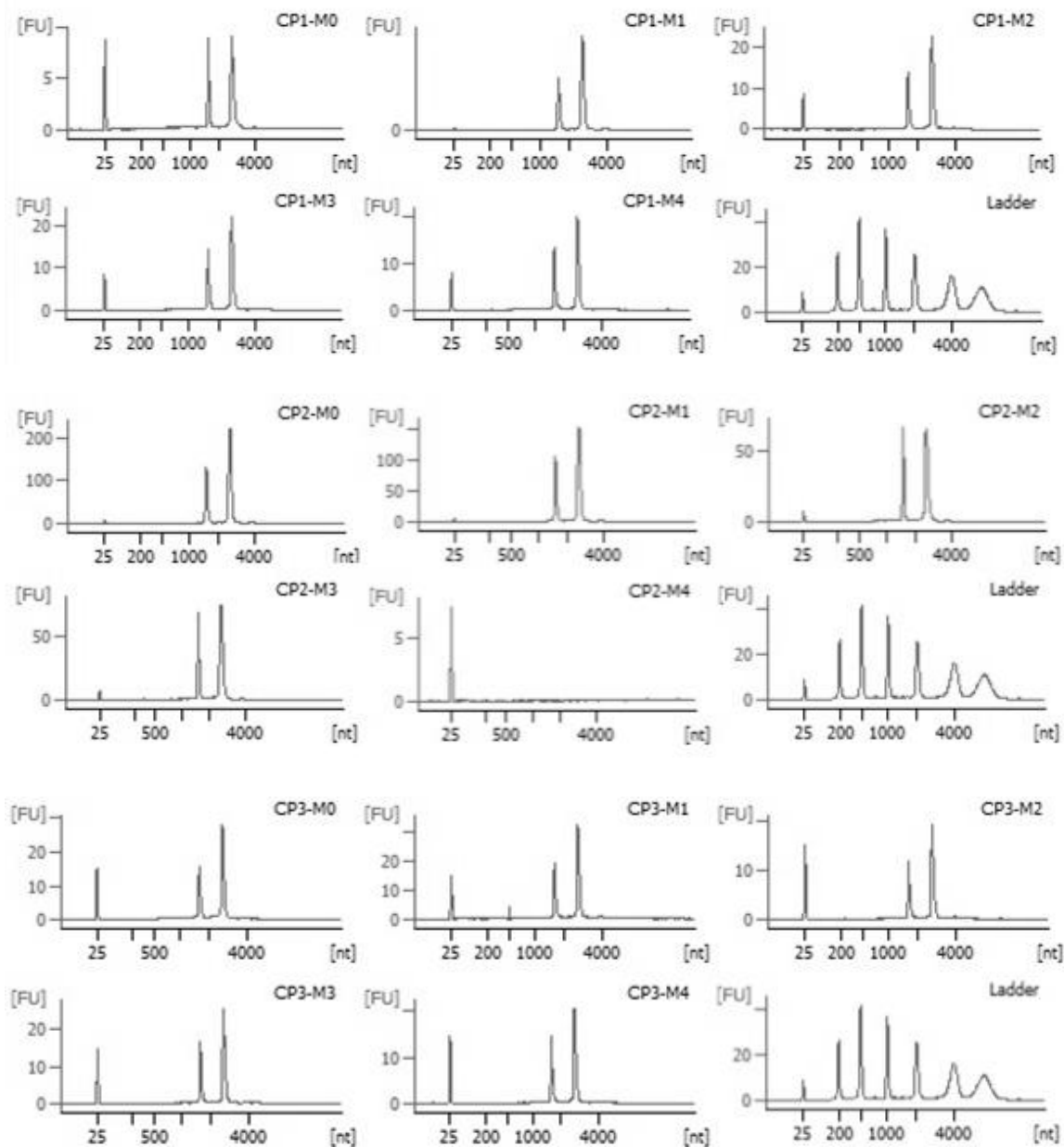


Figura 2. Electroferogramas del RNA total de los 5 tiempos de inducción de los cultivos CP1, CP2 y CP3. Los dos picos altos corresponden a los RNA ribosomales 18S y 26S, respectivamente. El último electroferograma (Ladder) corresponde al marcador empleado por el equipo bioanalizador para determinar el tamaño molecular de los picos de RNA.

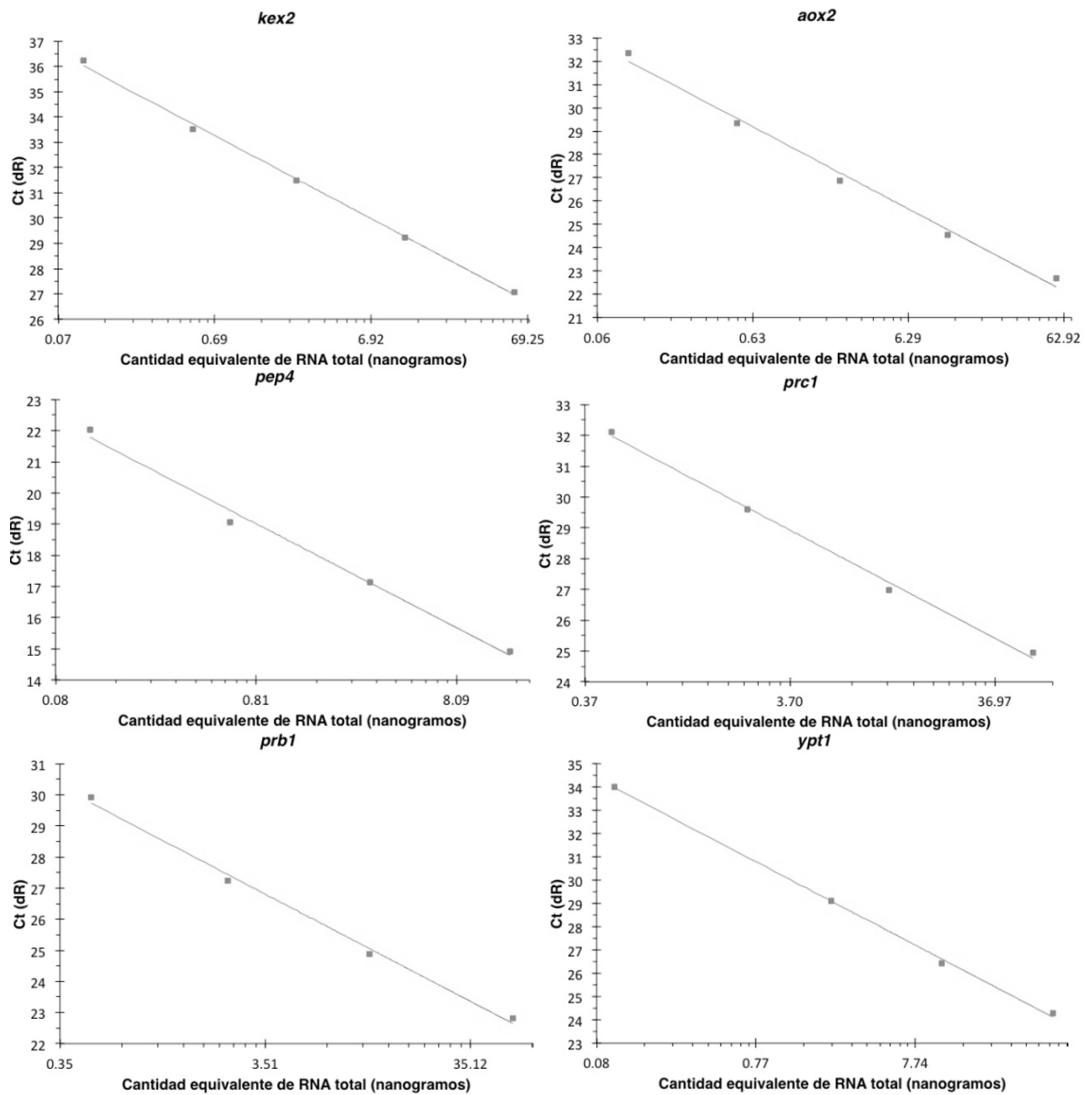


Figura 3. Correlación de los valores del ciclo umbral (C_T) respecto al logaritmo de la cantidad equivalente de RNA, obtenida a partir de las curvas de amplificación de los genes *KEX2*, *AOX2*, *PEP4*, *PRC1*, *PRB1* y *YPT1*, generadas a partir diluciones seriadas del DNAc correspondiente al tiempo de 68 h de inducción con metanol del cultivo CM1.

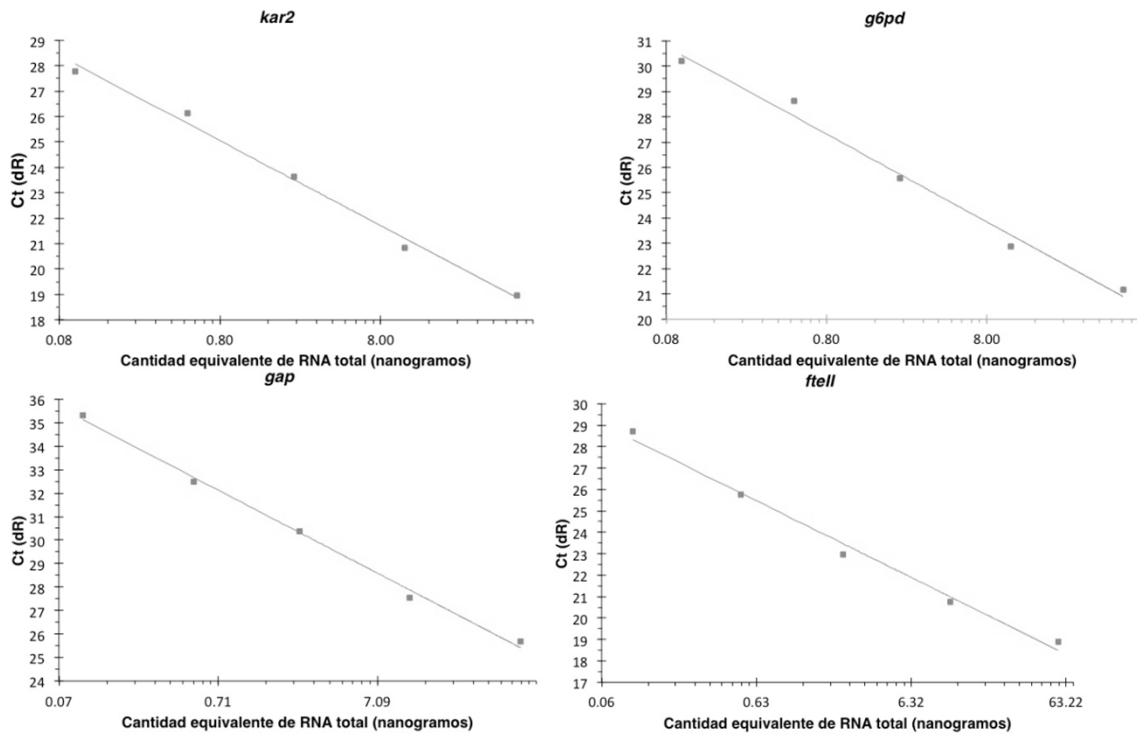


Figura 4. Correlación de los valores del ciclo umbral (C_T) respecto al logaritmo de la cantidad equivalente de RNA, obtenida a partir de las curvas de amplificación de los genes *KAR2*, *G6PD*, *GAP* y *FTEII*, generadas a partir diluciones seriadas del DNAC correspondiente al tiempo de 68 h de inducción con metanol del cultivo CM1.

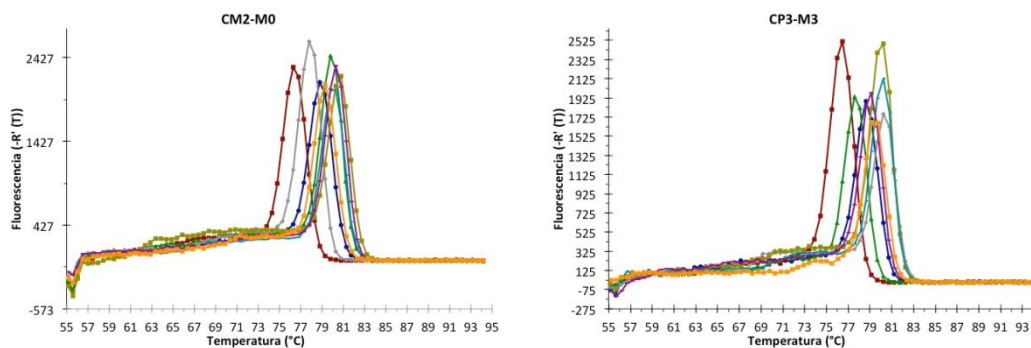


Figura 5. Curva de disociación para los genes en estudio expresada como la derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura. Se observa un sólo pico de emisión de fluorescencia. Cada línea representa los DNAC empleados los cuales fueron sintetizados a partir de las muestras de RNA del tiempo de 0 h de inducción con metanol del cultivo CM2 (derecha) y el tiempo de 30 h de inducción con metanol del cultivo CP3 (izquierda) empleando SYBR green.

ANEXO III

CM	Tiempo (h)	Peso húmedo CM1 (g/L)	Peso húmedo CM2 (g/L)	Peso húmedo CM3 (g/L)	X	S	CV%	Tiempo (h)
	0	90.8	89.1	89.1	89.7	1.0	1.1	0
	7	84.3	89.1	89.3	87.5	2.8	3.3	7
	19	85.5	90.3	98.1	91.3	6.4	7.0	19
	21	84.5	90.2	89.1	87.9	3.0	3.4	21
	30	101.6	79.7	92.3	91.2	11.0	12.1	30
	42	102.5	94.6	108.3	101.8	6.9	6.8	42
	47	102.5	109.5	108.3	106.7	3.8	3.5	47
	56	118.2	119.2	104.5	114.0	8.2	7.2	56
	68	121.7	128.2	106.1	118.7	11.4	9.6	68
CP	Tiempo (h)	Peso húmedo CP1 (g/L)	Peso húmedo CP2 (g/L)	Peso húmedo CP3 (g/L)	X	S	CV%	Tiempo (h)
	0	86.4	89.2	84.2	86.6	2.5	2.9	0
	4	87.9	87.5	84.7	86.7	1.7	2.0	4
	21	88.1	91.4	89.2	89.5	1.7	1.9	21
	30	83.2	88.1	95.1	88.8	6.0	6.8	30
	42	84.2	83.8	83.1	83.7	0.6	0.7	42
	47	83.5	81.1	80.4	81.7	1.6	2.0	47
	68	70.0	65.2	68.9	68.0	2.5	3.7	68

Figura 1. Tabla de Microsoft Excel con los valores correspondientes a la densidad celular en peso húmedo de los cultivos CM y CP.

CM	Tiempo (h)	Secreción CM1 (%)	Secreción CM2 (%)	Secreción CM3 (%)	X	S	CV%
	0	76.4	71.6	70.3	72.8	3.2	4.4
	7	77.3	48.9	67.1	64.5	14.4	22.3
	19	74.3	80.4	73.2	76.0	3.9	5.1
	21	73.9	98.2	77.2	83.1	13.2	15.9
	30	83.7	91.0	91.8	88.8	4.5	5.0
	42	83.6	92.3	90.9	89.0	4.7	5.3
	47	86.5	86.3	91.5	88.1	2.9	3.3
	56	88.5	87.1	88.8	88.1	1.0	1.1
	68	87.1	87.2	88.0	87.4	0.5	0.6
CP	Tiempo (h)	Secreción CP1 (%)	Secreción CP2 (%)	Secreción CP3 (%)	X	S	CV%
	0	74.3	69.3	77.2	73.6	4.0	5.5
	4	80.0	75.9	73.1	76.3	3.5	4.5
	21	77.3	72.4	63.2	71.0	7.1	10.1
	30	70.3	70.7	71.2	70.7	0.4	0.6
	42	63.8	64.7	61.6	63.4	1.6	2.5
	47	62.0	56.4	51.8	56.7	5.1	9.0
	68	56.3	59.1	53.3	56.3	2.9	5.2

Figura 2. Tabla de Microsoft Excel con los valores correspondientes a la secreción de fitasa (%) determinada por ELISA de los cultivos CM y CP.

CM	Tiempo (h)	Proteasas CM1 (mU/L)	Proteasas CM2 (mU/L)	Proteasas CM3 (mU/L)	X	S	CV%
	0	4.7	4.2	2.9	3.9	0.9	23.9
	21	3.1	4.2	6.8	4.7	1.9	41.0
	30	5.0	9.7	14.4	9.7	4.7	48.8
	47	7.6	5.4	12.0	8.3	3.4	40.7
	68	11.7	13.4	15.4	13.5	1.8	13.5
CP	Tiempo (h)	Proteasas CP1 (mU/L)	Proteasas CP2 (mU/L)	Proteasas CP3 (mU/L)	X	S	CV%
	0	5.6	4.3	3.7	4.5	1.0	21.4
	21	37.1	34.6	49.6	40.4	8.0	19.9
	30	33.2	36.9	64.8	45.0	17.3	38.3
	47	64.8	70.9	68.3	68.0	3.0	4.5
	68	57.6	56.6	54.1	56.1	1.8	3.2

Figura 3. Tabla de Microsoft Excel con los valores correspondientes a los valores de proteasas extracelulares de los cultivos CM y CP.

Tiempo (h)	Actividad CM1 (U/mL)	Actividad CM2 (U/mL)	Actividad CM3 (U/mL)	X	S	CV%
0	46859.7	44883.3	56819.6	49520.8	6397.7	12.9
7	55116.2	47245.0	82417.9	61593.0	18459.3	30.0
19	130762.8	72445.1	182261.0	128489.6	54943.2	42.8
21	126114.6	150362.5	208603.9	161693.7	42396.0	26.2
30	179064.0	194127.8	241134.7	204775.5	32376.3	15.8
42	221147.2	283348.2	293492.0	265995.8	39169.8	14.7
47	265420.3	332117.9	351788.1	316442.1	45267.5	14.3
56	317758.3	507691.4	521021.3	448823.7	113701.5	25.3
68	649896.6	671923.8	703462.8	675094.4	26923.5	4.0
Tiempo (h)	Actividad CP1 (U/mL)	Actividad CP2 (U/mL)	Actividad CP3 (U/mL)	X	S	CV%
0	45301.1	24696.4	35649.4	35215.6	10309.2	29.3
4	49147.3	25860.3	35079.0	36695.5	11727.4	32.0
21	52855.4	38654.4	46670.8	46060.2	7120.2	15.5
30	99103.5	59200.7	61524.1	73276.1	22397.3	30.6
42	89730.4	74449.6	73428.3	79202.8	9131.5	11.5
47	101972.6	86288.0	78631.1	88963.9	11898.6	13.4
68	100060.8	86818.5	90115.2	92331.5	6893.7	7.5

Figura 4. Tabla de Microsoft Excel con los valores correspondientes a los valores de producción total de fitasa de los cultivos CM y CP.

CM	Tiempo (h)	CM1	CM2	CM3	X	S	CV%
	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0
	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.0
	19	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	4.3
	21	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	4.3
	30	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	3.9
	42	0.7	0.7	0.7	0.7	0.0	4.5
	47	0.8	0.8	0.7	0.8	0.1	6.8
	56	1.0	1.0	0.8	0.9	0.1	8.1
	68	1.5	1.6	1.3	1.5	0.1	9.8
CP	Tiempo (h)	CP1	CP2	CP3	X	S	CV%
	0	0.00	0.00	0.00	0.0	0.0	87.3
	4	0.01	0.01	0.01	0.0	0.0	17.0
	21	0.02	0.03	0.03	0.0	0.0	22.3
	30	0.03	0.04	0.05	0.0	0.0	29.0
	42	0.05	0.05	0.08	0.1	0.0	29.7
	47	0.05	0.05	0.08	0.1	0.0	28.4
	68	0.08	0.08	0.13	0.1	0.0	29.8

Figura 5. Tabla de Microsoft Excel con los valores correspondientes a los valores de consumo de metanol de los cultivos CM y CP.

Anexo IV

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- Medio YPD. Pesar 20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura, disolver en 900 mL de agua bidestilada. Esterilizar por autoclaveado 20 minutos a 15 lb/pulg², 121°C. Dejar enfriar y por separado agregar 100 mL de solución 10 XD.
- 10 XD (Glucosa 20%). Disolver 20 g de glucosa en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.
- Buffer de fosfatos 1M, pH =6. Disolver 1.03 g de K₂HPO₄ y 12.8 g de KH₂PO₄ en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH con H₃PO₄ o con KOH, aforar a 100 mL y esterilizar 20 minutos a 15 lb/pulg² a 121°C. Almacenar a temperatura ambiente.
- 500X B. (Biotina 0.02%). Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración y almacenar a 4 °C.
- 10X G. (Glicerol 10%). Mezclar 100 mL de glicerol con 900 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración o autoclave. Almacenar a 4°C.
- 10X YNB. (Base de levadura nitrogenada con sulfato de amonio y sin aminoácidos 13.4%) Disolver 134 g de YNB en 1000 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C
- YPD. (Peptona 2%, extracto de levadura 1%, dextrosa 2%). Disolver 20g de peptona, 10g de extracto de levadura en 900 mL de agua destilada, esterilizar 20 min a 15 lb/pulg² a 121°C, dejar enfriar y agregar 100 mL de 10 XD. Almacenar a 4°C.
- BMGY (Peptona 2%, extracto de levadura 1%, 1.34% de YNB, 100 mM de buffer de fosfatos, 4x10⁻⁵% de biotina, glicerol 1%). Disolver 10 g de extracto de levadura, 20 g de 50 peptona en 700 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave por 20 minutos y enfriar a temperatura ambiente. Agregar por separado las siguientes soluciones y mezclar: 100 mL de buffer de fosfatos 1M pH=6.0, 100 mL de YNB 10X, 2 mL de biotina 500 X y 100 mL de glicerol 10X. Almacenar a 4°C.
- SBG-50 (Sales basales suplementado con glicerol 50 g/L). En un vaso de precipitados de 100 mL, pesar 1.86 g de CaSO₄•2H₂O, 8.32 g de KOH, 29.80 de MgSO₄•7H₂O y 36.40 g de K₂SO₄, y disolver en 1 litro de agua y 53.4 mL de

H₃PO₄ empleando una jarra de 5 litros (observar que la solución se vuelva transparente). Pesar 100 g de glicerol en un vaso de precipitados de 200 mL y añadir a la solución anterior para su disolución. Medir con la ayuda de una probeta de 250 mL un volumen de 1 litro de agua, enjuagar el vaso de precipitados que tenía el glicerol y agregarla a la solución anterior, continuar agitando hasta que la solución tenga una apariencia homogénea y translúcida.

- Sales en trazas (PTM1). Se empleó una solución preparada por Invitrogen (Fermentation PTM1 Trace Salts, Cat. No. Q300-12) que contiene las siguientes sales: CuSO₄ 24 mM, NaI 0.53 mM, MnSO₄ 19.87 mM, Na₂MoO₄ 0.83 mM, H₃BO₃ 0.32 mM, CoCl₂ 2.10 mM, ZnCl₂ 0.15 mM, FeSO₄ 0.23 mM y biotina 0.82 mM. Esta solución se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C en alícuotas de 12 y 6 mL hasta su uso. Siempre que se empleó esta solución se adiciono el mismo volumen de biotina 500X recién preparada.
- Reactivo de Coomassie. 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 Whatman no. 1 para eliminar el colorante no disuelto. Guardar el reactivo en un frasco oscuro a 4°C.
- Solución de albúmina sérica bovina (50 Rg/RL). Pesar 5 mg de ASB en un matraz de aforación de 5 mL y aforar con agua destilada (ASB 1 Ug/UL). Colocar 250 UL de esta solución en un matraz de aforación de 5 mL y aforar con agua destilada.

LITERATURA CITADA

1. Aizemberg R, Terrazas WDM, Ferreira-Dias S, Valentini SR, Gattâs EAL. 2011. Optimal conditions for biomass and recombinant glycerol kinase production using the yeast *Pichia pastoris*. *Food Technology and Biotechnology* 49:329-335.
2. Anthony J. 2003. Design of experiments for engineers and scientists. Butterworth-Heinemann, Elsevier, Jordan Hill, Oxford.
3. Arnau C, Ramon R, Casas C, Valero F. 2010. Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. *Enzyme and Microbial Technology* 46:494–500.
4. Barrigón JM, Montesinos JM, Valero F. 2013. Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut⁺ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures?. *Biochemical Engineering Journal* 75: 47-54.
5. Bayraktar E. 2009. Effects of pH on human growth hormone production by *Pichia pastoris* considering the expression levels of regulatory genes. Tesis de Maestría. Middle East Technical University (Turquía). Documento en línea: <http://etd.lib.metu.edu.tr/upload/12610882/index.pdf>.
6. Bora N, Bawa Z, Bill RM, Wilks MDB. 2012. The implementation of a design of experiments strategy to increase recombinant protein yields in yeast (Review), In: Recombinant protein production in yeast. *Methods in molecular biology*, Bill RM, vol 866. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 115-127.

7. Brierley RA, Bussineau C, Kosson R, Melton A, Siegel RS. 1990. Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. *Annals of the New York Academy of Sciences* 589:350-362.
8. Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*, 29:23–39.
9. Çalik, P, Bayraktar E, Inankur B, Soyaslan ES, Sahin M, Taspinar H, Acik E, Yilmaz R, Özdamar TH. 2010. Influence of pH on recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 85:1628–1635.
10. Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Zuñiga-Charles MA, Galindo JM, Said-Fernández S. 2000. Mg, Mn, and Co ions enhance the formation of *Entamoeba histolytica* cyst-like structures resistant to sodium dodecyl sulfate. *Archives of Medical Research* 31:162-168.
11. Canales M, de la Lastra JM, Naranjo V, Nijhof AM, Hope M, Jongejan F, de la Fuente J. 2008. Expression of recombinant Rhipicephalus (*Boophilus*) microplus, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. *BMC biotechnology* 8:14.
12. Castillo Galván M. 2008. Evaluación de la producción de la Fitasa C de *Bacillus subtilis* en cepas recombinantes de *Pichia pastoris* Mut^s. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León (México).
13. Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology* 13:329–332.
14. Cereghino JL, Cregg JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24:45-66.
15. Chen CC, W PH, Huang CT, Cheng KJ. 2004. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enzyme and Microbial Technology* 35:315–320

16. Colao MC, Lupino S, Garzillo AM, Buonocore V, Ruzzi M. 2006. Heterologous expression of *lcc 1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microbial Cell Factories*. 13:31–42.
17. Cos O, Ramón R, Montesinos JL, Valero F. 2006. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microbial Cell Factories* 5:17.
18. Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F. 2005. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Journal of biotechnology* 116:321–35.
19. Cregg, JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, and Stillman, CA. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology* 9: 1316–1323.
20. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*.16:23-52.
21. d’Anjou MC, Daugulis AJ. 1997. A model-based feeding strategy for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology techniques* 11:865-868.
22. d’Anjou MC, Daugulis AJ. 2001. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 72:1-11.
23. Damasceno LM, Pla I, Chang HJ, Cohen L, Ritter G, Old LJ, Batt CA. 2004. An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 37:18-26.
24. Damaso MCT, Almeida MS, Kurtenbach E, Martins OB, Pereira N, Andrade CM, Albano RM. 2003. Optimized expression of a thermostable xylanase from

Thermomyces lanuginosus in *Pichia pastoris*. Applied and environmental microbiology 69:6064–6072.

25. De Schutter K, Lin YC, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouzé P, Van de Peer Y, Callewaert N. 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. Nature Biotechnology 27:561-566.
26. Dietzsch C, Spadiut O, Herwig C. 2011. A fast approach to determine a fed batch feeding profile for recombinant *Pichia pastoris* strains. Microbial Cell Factories 10: 85–95.
27. Dragosits M, Frascotti G, Bernard-Granger L, Vázquez F, Giuliani M, Baumann K, Rodríguez-Carmona E, Tokkanen J, Parrilli E, Wiebe MG, Kunert R, Maurer M, Gasser B, Sauer M, Branduardi P, Pakula T, Saloheimo M, Penttilä M, Ferrer P, Luisa Tutino M, Villaverde A, Porro D, Mattanovich D. 2010. Influence of growth temperature on the production of antibody Fab fragments in different microbes: a host comparative analysis. Biotechnology progress 27:38–46.
28. Dragosits M, Stadlmann J, Albiol J, Baumann K, Maurer M, Gasser B, Sauer M, Altmann F, Ferrer P, Mattanovich D. 2009. The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. Journal of Proteome Research 8:1380-1392.
29. Felix Castro MB. Análisis de la expresión de genes involucrados en los procesos de secreción, proteólisis y metabolismo del metanol de la cepa KM71FTEII de *Pichia pastoris* cultivada a dos condiciones de cultivo. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo Leon (México).
30. Fiske CH, Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. Journal of Biological Chemistry. 66: 375-400.
31. Fredericks D, Clay R, Warner T, O'Connor A, de Kretser DM, Hearn MT. 2010. Optimization of the expression of recombinant human activin A in the yeast *Pichia pastoris*. Biotechnology progress 26:372–83.

32. Gasser B, Maurer M, Rautio J, Sauer M, Bhattacharyya A, Saloheimo M, Penttilä M, Mattanovich D. 2007. Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions BMC genomics 8:179.
33. Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodríguez-Carmona E, Baumann K, Giuliani M, Parrilli E, Branduardi P, Lang C, Porro D, Ferrer P, Tutino ML, Mattanovich D, Villaverde A. 2008. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. Microbial cell factories 7:11.
34. Guerrero-Olazarán M, Barrera-Saldaña HA, Viader-Salvadó JM. 2001. Levaduras metilotróficas modificadas genéticamente para la producción y secreción de hormona del crecimiento humano. Mexican patent application:203,194. July 2001.
35. Guerrero-Olazarán M, Barrera-Saldaña HA, Viader-Salvadó JM. 2002. Modified methylotrophic *Pichia pastoris* yeast which secretes human growth hormone. United States patent application: 6,342,375 B1. January 2002
36. Guerrero-Olazarán M, Escamilla-Treviño LL, Castillo-Galván M, Gallegos-López JA, Viader-Salvadó JM. 2009. Recombinant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) trypsinogen production in *Pichia pastoris*. Biotechnology Progress 25:1310-1316.
37. Guerrero-Olazarán M, Rodríguez-Blanco L, Carreón-Treviño JG, Gallegos-López JA, Viader-Salvadó JM. 2010. Expression of a *Bacillus* phytase C gene in *Pichia pastoris* and properties of the recombinant enzyme. Applied and Environmental Microbiology 76:5601-5608.
38. Ha NC, Oh BC, Shin S, Kim HJ, Oh TK, Kim YO, Choi KY, Oh BH. 2000. Crystal structures of a novel thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. Nature Structural & Molecular Biology 7:147-153.
39. Habeeb, AFSA. 1966. Determination of free amino groups in proteins by tri n i trobenzenesulphonic acid. Analytical Biochemistry 14:328-336

40. Higgins DR, Cregg JM. 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. In: *Pichia* protocols: Methods in molecular biology, Higgins DR, Cregg JM., vol 103. Totowa, New Jersey: Humana Press, pp. 1-15
41. Hollenberg CP, Gellissen G. 1997. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Current opinion in biotechnology* 8:554–560.
42. Holmes WJ, Darby RA, Wilks MD, Smith R, Bill RM. 2009. Developing a scalable model of recombinant protein yield from *Pichia pastoris*: the influence of culture conditions, biomass and induction regime. *Microbial Cell Factories* 8:35.
43. Hong F, Meinander NQ, Jönsson LJ. 2002. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 79:438-449.
44. Huang CJ, Damasceno LM, Anderson KA, Zhang S, Old LJ, Batt CA. 2011. A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90:235-247.
45. Inan M, Meagher MM. 2001. The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92:337–41.
46. Invitrogen. 2002. *Pichia* fermentation process guidelines. Life Technologies corporation. Carlsbad, CA. Disponible en el sitio de red: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pichiaferm_prot.pdf.
47. Jafari R, Sundström BE, Holm P. 2011. Optimization of production of the anti-keratin 8 single-chain Fv TS1-218 in *Pichia pastoris* using design of experiments. *Microbial cell factories* 10:34.
48. Jahic M, Gustavsson M, Jansen AK, Martinelle M, Enfors SO. 2003a. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of Biotechnology* 102:45–53.

49. Jahic M, Wallberg F, Bollok M, Garcia P, Enfors SO. 2003b. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microbial Cell Factories*. 2:6.
50. Jara P, Allais JJ, Baratti J. 1983. Isolation and Characterization of a Methanol Utilizing Yeast with High Cell Yield. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 17:19-23.
51. Jin H, Liu G, Dai K, Wang H, Li Z, Shi Z. 2011. Improvement of porcine interferon- α production by recombinant *Pichia pastoris* via induction at low methanol concentration and low temperature. *Applied biochemistry and biotechnology*: 165:559–71.
52. Jung G, Ueno H, Hayashi R. 1999. Carboxypeptidase Y: structural basis for protein sorting and catalytic triad. *Journal of biochemistry* 126:1–6.
53. Jungo C, Marison IW, von Stockar U. 2007. Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *Journal of Biotechnology* 128: 824-837.
54. Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 64:2079-2085.
55. Kim YO, Kim HK, Bae KS, Yu JH, Oh TK. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme and Microbial Technology* 22:2-7.
56. Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Ohi H, Tomomitsu K, Ohmura T. 2000. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89:55-61.
57. Krainer FW, Dietzsch C, Hajek T, Herwig C, Spadiut O, Glieder A. 2012. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microbial cell factories* 11:22.

58. Lee CY, Lee SJ, Jung KH, Katoh S, Lee EK. 2003. High dissolved oxygen tension enhances heterologous protein expression by recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* 38: 1147–1154.
59. Lei XG, Porres JM, Mullaney EJ, Brinch-Pedersen H. 2007. Phytase: source, structure and application. In: *Industrial enzymes: structure, function and applications*, Polaina J, MacCabe AP. Dordrecht, Netherlands: Springer, pp. 505-529.
60. Lei XG, Stahl CH. 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57:474-481.
61. Li Y, Bai J, Jian Q, Ye X, Lao H, Li X, Luo J, Liang X. 2003. Expression of common carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris* and growth stimulation of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216: 329-341.
62. Li P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüneş N, Renugopalakrishnan V. 2007. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 142:105–124.
63. Li Z, Xiong F, Lin Q, d’Anjou M, Daugulis AJ, Yang DS, Hew CL. 2001. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 21:438-445.
64. Lim BL, Yeung P, Cheng C, Hill JE. 2007. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME Journal* 1:321-330.
65. Lin-Cereghino J, Hashimoto MD, Moy A, Castelo J, Orazem CC, Kuo P, Xiong S, Gandhi V, Hatae CT, Chan A, Lin-Cereghino GP. 2008. Direct selection of *Pichia pastoris* expression strains using new G418 resistance vectors. *Yeast* 25:293–299.
66. Love KR, Politano TJ, Panagiotou V, Jiang B, Stadheim TA, Love JC. 2012. Systematic single-cell analysis of *Pichia pastoris* reveals secretory capacity limits productivity. *PloS one* 7:e37915.

67. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22:249–70.
68. Mandenius CF, Brundin A. 2008. Bioprocess optimization using design of experiments methodology. *Biotechnology Progress* 24:1191-1203.
69. Mattanovich D, Gasser B, Hohenblum H, Sauer M. 2004. Stress in recombinant protein producing yeasts. *Journal of Biotechnology* 113:121-135.
70. Mullaney EJ, Ullah AHJ. 2007. Phytases: attributes, catalytic mechanisms, and applications. In: *Inositol phosphates: linking agriculture and the environment*, Turner L, Richardson AE, Mullaney EJ. Oxfordshire, United Kingdom: CAB International, pp. 97-110.
71. Nelder JA and Mead R. 1965. A Simplex Method for Function Minimization. *The Computer Journal* 7: 308-313.
72. Nordén K, Agemark M, Danielson JÅ, Alexandersson E, Kjellbom P, Johanson U. 2011. Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnology* 11:47.
73. País-Chanfrau JM, García Y, Licor L, Besada V, Castellanos-Serra L, Cabello CI, Hernández L, Mansur M, Plana L, Hidalgo A, Támbara Y, del C Abrahantes-Pérez M, del Toro Y, Valdés J, Martínez E. 2004. Improving the expression of mini-proinsulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnology letters* 26:1269–1272.
74. Pfaffl MW. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. In: *A-Z of quantitative PCR*, Bustin SA, La Jolla, CA: IUL Biotechnology series, International University line, pp. 87–112.
75. Plantz BA, Sinha J, Villarete L, Nickerson KW, Schlegel VL. 2006. *Pichia pastoris* fermentation optimization: energy state and testing a growth-associated model. *Applied microbiology and biotechnology* 72:297–305.
76. Pritchett J, Baldwin SA. 2004. The effect of nitrogen source on yield and glycosylation of a human cystatin C mutant expressed in *Pichia pastoris*. *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 31:553-558.

77. Ramón R, Ferrer P, Valero F. 2007. Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 130:39-46.
78. Resina D, Bollók M, Khatri NK, Valero F, Neubauer P, Ferrer P. 2007. Transcriptional response of *P. pastoris* in fed-batch cultivations to *Rhizopus oryzae* lipase production reveals UPR induction. *Microbial Cell Factories* 6:21.
79. Romanos M. 1995 Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*. 6: 527-533
80. Sauer M, Branduardi P, Gasser B, Valli M, Maurer M, Porro D, Mattanovich D. 2004. Differential gene expression in recombinant *Pichia pastoris* analysed by heterologous DNA microarray hybridisation. *Microbial cell factories* 3:17.
81. Scott JH. 2007. Multivariate Statistical Analysis of Compositional Data within the Simplex. *Microscopy and Microanalysis*, 13:1368–1369.
82. Shavers CL, Parsons ML, Deming SN. 1979. *Simplex* optimization of chemical systems. *Journal of Chemical Education* 56:307-309.
83. Shin S, Ha NC, Oh BC, Oh TK, Oh BH. 2001. Enzyme mechanism and catalytic property of beta propeller phytase. *Structure* 9:851-858.
84. Sinha J, Plantz BA, Inan M, Meagher MM. 2005. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau. *Biotechnology and Bioengineering*, 89:102–12.
85. Sinha J, Plantz BA, Zhang W, Gouthro M, Schlegel V, Liu CP, Meagher MM. 2003. Improved production of recombinant ovine interferon-tau by Mut⁺ strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile. *Biotechnology Progress* 19:794-802.
86. Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A, Birkenberger LA. 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 190:55–62.

87. Sreekrishna K. *Pichia*, optimization of protein expression. 2010. In: Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology, Flickinger MC. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., pp. 1-16.
88. Stratton J, Chiruvolu V, Meagher M. 1998. High cell-density fermentation. In: *Pichia* protocols: Methods in molecular biology, Higgins DR, Creeg JM., vol 103. Totowa, New Jersey: Humana Press, pp. 107-120.
89. Su Z, Wu X, Feng Y, Ding C, Xiao Y, Cai L, Feng W, Li X. 2007. High level expression of human endostatin in *Pichia pastoris* using a synthetic gene construct. *Applied microbiology and biotechnology*, 73:1355–62.
90. Teng D, Fan Y, Yang YL, Tian ZG, Luo J, Wang JH. 2007. Codon optimization of *Bacillus licheniformis* beta-1,3-1,4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology*, 74:1074–83.
91. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 101:249–58.
92. Trinh LB, Phue JN, Shiloach J. 2003. Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 82:438-444.
93. Valero F. 2013. Bioprocess Engineering of *Pichia pastoris*, an Exciting Host Eukaryotic Cell Expression System. In: Protein Engineering -Technology and Application, Tomohisa Ogawa, pp: 1-32.
94. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44:619–26.
95. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3:research0034.

96. Viader-Salvadó JM, Flores-Gracia J, Vega-Alonso AS, Treviño-Alvarado VM, Molina-Torres CA, Vera-Cabrera L, Guerrero-Olazarán M. 2009. Simplified amplified-fragment length polymorphism method for genotyping *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Microbiological Methods* 78:331-338.
97. Viader-Salvadó JM, Fuentes-Garibay JA, Castillo-Galván M, Iracheta-Cárdenas MM, Galán-Wong LJ, Guerrero-Olazarán M. 2013. Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) trypsinogen production in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Biotechnology Progress* 29:11-6.
98. Viader-Salvadó JM, Gallegos-López JA, Carreón-Treviño JG, Castillo-Galván M, Rojo-Domínguez A, Guerrero-Olazarán M. 2010. Design of thermostable beta-propeller phytases with activity over a broad range of pHs and their overproduction by *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 76:6423-6430.
99. Wan L, Zhu S, Li Y, Liu S, Yang H, Li S, Li Y, Cheng J, Lu X . 2011. Production and characterization of LEA29Y, a variant of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin, in *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology*, 91:543–51.
100. Wang Y, Wang Z, Xu Q, Du G, Hua Z, Liu L, Li J, Chen J. 2009. Lowering induction temperature for enhanced production of polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* 44:949-954.
101. Werten MWT, de Wolf FA, 2005. Reduced proteolysis of secreted gelatin and Yps1-mediated alpha-factor leader processing in a *Pichia pastoris* *kex2* disruptant. *Applied and environmental microbiology* 71: 2310-7.
102. Woo JH, Liu YY, Stavrou S, Neville DM Jr. 2004. Increasing Secretion of a Bivalent Anti-T-Cell Immunotoxin by *Pichia pastoris*. *Applied and environmental microbiology* 70:3370–3376.
103. Wu M, Shen Q, Yang Y, Zhang S, Qu W, Chen J, Sun H, Chen S. 2013. Disruption of YPS1 and PEP4 genes reduces proteolytic degradation of secreted HSA/PTH in *Pichia pastoris* GS115. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 40:589–99.

104. Xie JL, Zhou QW, Pen D, Gan RB, Qin Y. 2005. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. *Enzyme and Microbial Technology*, 36:210–216.
105. Yang S, Kuang Y, Li H, Liu Y, Hui X, Li P, Jiang Z, Zhou Y, Wang Y, Xu A, Li S, Liu P, Wu D. 2013. Enhanced production of recombinant secretory proteins in *Pichia pastoris* by optimizing Kex2 P1' site. *PLoS ONE* 8:e75347.
106. Yang J, Zhou X, Zhang Y. 2004. Improvement of recombinant hirudin production by controlling NH₄⁺ concentration in *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology letters*, 26:1013–7.
107. Yang L, Dong W, He J, Ren X, Yan W. 2008. Expression and purification of natural N-terminal recombinant bovine pancreatic trypsin inhibitor from *Pichia pastoris*. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 31:1680–5.
108. Yang P, Shi P, Wang Y, Bai Y, Meng K, Luo H, Yuan T, Yao B. 2007. Cloning and Overexpression of a β -Glucanase in Purification and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17:58–66.
109. Yinghua Li, Junjie Bai, Qing Jian, Xing Ye, Haihua Lao, Xinhui Li, Jianren Luo, Xufang Liang. 2003. Expression of common carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris* and growth stimulation of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216:329–41.
110. Zhang W, Bevins MA, Plantz BA, Smith LA, Meagher MM. 2000. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnology and Bioengineering* 70:1-8.
111. Zhang Y, Liu R, Wu X. 2007. The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Annals of Microbiology* 57: 553-560.

112. Zhou C, Li D, Wu M, Wang W. 2007. Optimized expression of an acid xylanase from *Aspergillus usarii* in *Pichia pastoris* and its biochemical characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:1393–1401.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Miguel Castillo Galván

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología

Tesis: ANÁLISIS DE LA RESPUESTA METABÓLICA INVOLUCRADA EN LA OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN LA LEVADURA METILOTRÓFICA *Pichia pastoris*.

Campo de Estudio: Biotecnología

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 17 de Junio de 1983, hijo de Mirna Irasema Galván Chapa. Actualmente se encuentra casado con Manuela Citlali Chacón Cardosa y juntos residen en la ciudad de Monterrey N.L.

Educación: Egresado como Químico Bacteriólogo Parasitólogo en la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2006.

Experiencia profesional: Docente de medio tiempo en bachillerato por la Universidad del Valle de México desde 2011. Profesional del manejo y distribución de información científica publicada en Reprints Desk Latin America desde 2012.