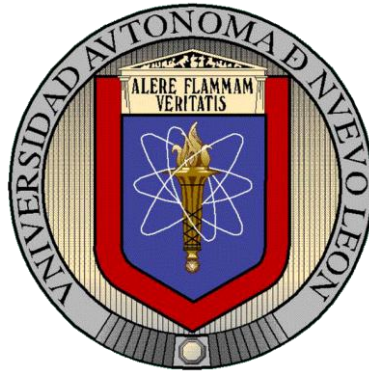


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



RESPUESTA FISIOLÓGICA DE CEPAS DE *Pichia pastoris* A CONDICIONES DE  
SOBREPRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS REGULADAS POR  
EL PROMOTOR CONSTITUTIVO *GAP*

Por

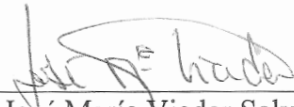
L.B.G. Ana Lucía Herrera Estala

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
con Orientación en Biotecnología

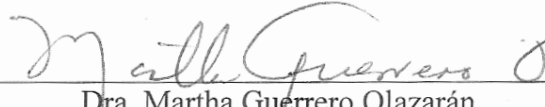
Diciembre, 2019

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE CEPAS DE *Pichia pastoris* A CONDICIONES DE  
SOBREPRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS REGULADAS  
POR EL PROMOTOR CONSTITUTIVO *GAP*

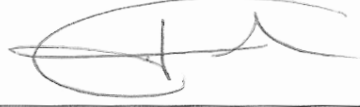
Comité de Tesis



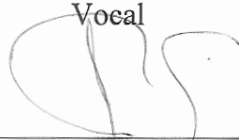
Dr. José María Viader Salvadó  
Presidente



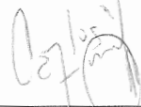
Dra. Martha Guerrero Olazarán  
Secretario



Dr. Juan Antonio Gallegos López  
Vocal

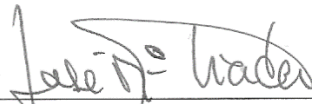


Dr. Benito Pereyra Alférez  
Vocal



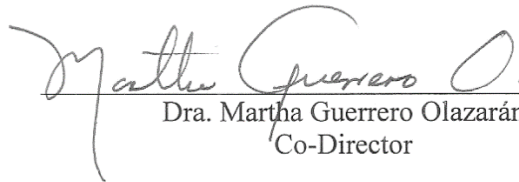
Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna  
Vocal

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE CEPAS DE *Pichia pastoris* A CONDICIONES DE  
SOBREPRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS REGULADAS  
POR EL PROMOTOR CONSTITUTIVO *GAP*



---

Dr. José María Viader Salvadó  
Director



---

Dra. Martha Guerrero Olazarán  
Co-Director

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por otorgarme la beca que me permitió empezar, continuar y concluir este proyecto.

Al Dr. Viader por todo el apoyo brindado, sus correcciones y enseñanzas durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por aguantarme este tiempo.

A la Dra. Martha Guerrero, por permitirme ingresar al laboratorio en primer lugar y ser parte del equipo de trabajo durante estos años y por sus enseñanzas y regaños.

A la MC. Eddy Luz, por su ayuda desinteresada y enseñanzas que me permitieron iniciar este trabajo. Gracias por el apoyo brindado todo este tiempo.

Al Dr. Antonio por sus enseñanzas todos estos años desde que entre al laboratorio como estudiante de servicio social. Gracias por todas las recomendaciones, enseñanzas, historias macabras, anécdotas, y por todas las cervezas. Salud.

A mis padres que sé que me cuidan y me llevan a todos lados.

A mis hermanos, que son bien latosos pero que me apoyan en todo y sin ellos no habría podido realizar muchas cosas en mi vida. Son los mejores.

A Noé por hacerme reír cuando más lo necesitaba y ser el mejor. Gracias por motivarme a dar siempre el máximo. Y por los memes.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Karla Fernández, David Gutiérrez, Mariana Sánchez, Alber, Everardo, Fabián, Rebeca, Abel, Daniela, Daniel E, Diana, Nancy, Yanelis, y a todos los que han estado en el laboratorio este tiempo y que hicieron que fuera más divertido el trabajo.

A mi kouhai Daniel, por apoyarme durante la escritura (intensa) de la tesis. Al lolz\_clan por sus porras constantes, aunque no entiendan que es lo que hago.

A mis compañeros de la generación del doctorado Ernesto, Karla, Nahui, David, Claudia, Exiquio, Claudio, Luis, Jaime. Si se pudo jajaja.

Al L4 y al L9 por prestarnos sus equipos en tiempos de necesidad

Y a ★

## DEDICATORIAS

*A mis padres*

*A mis hermanos*

*A mi tía Cosme, quien, aunque no entendía lo que le decía o lo que hacía  
estaba al pendiente. Hasta que nos volvamos a ver.*

# ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS .....	IV
DEDICATORIAS.....	V
ÍNDICE .....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XV
LISTA DE ECUACIONES .....	XVII
RESUMEN.....	XVIII
ABSTRACT.....	XIX
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
2.1. Producción de proteínas recombinantes .....	2
2.2. <i>Pichia pastoris</i> como organismo modelo para la producción de proteínas recombinantes .....	3
2.2.1. Sistema de expresión de <i>P. pastoris</i> .....	3
2.2.1.1. Cepas de <i>P. pastoris</i> empleadas para la producción de proteínas recombinantes .....	3
2.2.1.2. Vectores de expresión empleados en el sistema de expresión de <i>P. pastoris</i> .....	4
2.2.1.3. Promotores empleados en los sistemas de expresión en <i>P. pastoris</i> .....	6
2.2.1.3.1. El promotor <i>AOXI</i> .....	6
2.2.1.3.2. El promotor <i>GAP</i> .....	6
2.2.1.3.3. Ingeniería de promotores .....	6
2.2.2. Metabolismo de la fuente de carbono en <i>P. pastoris</i> .....	7
2.2.3. Secreción de proteínas en <i>P. pastoris</i> .....	8
2.3. Bioprocesos con <i>P. pastoris</i> .....	11
2.3.1. Cultivos en lote alimentado (fed-batch) .....	15
2.3.2. Cultivos continuos .....	15
2.3.3. Efecto de condiciones de cultivo para la producción de proteínas heterólogas en bioprocesos con <i>P. pastoris</i> .....	16
2.3.3.1. Fuente de carbono .....	16
2.3.3.2. pH .....	17

2.3.3.3. Temperatura .....	17
2.3.3.4. Aireación y oxígeno disuelto .....	17
2.3.3.5. Velocidad específica de crecimiento y cinética de producción .....	18
2.3.4. Efectos multifactoriales de las condiciones de cultivo .....	18
2.4. Secuenciación del genoma de <i>P. pastoris</i> e importancia en los estudios de expresión de genes en <i>P. pastoris</i> .....	20
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
6.1. Estrategia general .....	24
6.2. Construcción de cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> portadoras del gen heterólogo <i>FTEII</i> regulado por el promotor <i>GAP</i> .....	26
6.2.1. Obtención y caracterización de DNA plasmídico de <i>Escherichia. coli</i> JM109 pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX .....	26
6.2.2. Digestión preparativa de los plásmidos pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>NotI</i> .....	28
6.2.3. Construcción del plásmido pGAHFTEII y transformación en <i>E. coli</i> TOP10 30	
6.2.4. Preparación a mediana escala del plásmido pGAHFTEII y transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 .....	33
6.2.5. Caracterización genotípica de las cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> KM71GAHFTEII .....	36
6.3. Selección de cepas de <i>P. pastoris</i> sobreproductoras de la proteína recombinante FTEII regulada por el promotor <i>GAP</i> .....	37
6.3.1. Cultivos en tubo agitado .....	37
6.3.2. Determinación de la producción de proteínas extracelulares y rendimiento proteínas extracelulares/biomasa .....	38
6.3.3. Cultivos en matraz .....	39
6.3.4. Determinación de la producción de proteínas extracelulares, producción de fitasa y rendimiento actividad de fitasa/biomasa ( $Y_{p/x}$ ) .....	39
6.4. Optimización de cuatro factores que constituyen las condiciones de cultivo para incrementar la productividad volumétrica extracelular .....	43
6.4.1. Diseño del proceso de optimización empleando el método simplex secuencial 43	
6.4.2. Estrategia de cultivo en biorreactor de 7L .....	45
6.4.3. Generación de inóculos para cultivos en biorreactor .....	45

6.4.4. Cultivo en lote en glicerol .....	46
6.4.5. Cultivo en lote alimentado con glicerol.....	47
6.4.6. Determinación de parámetros fisiológicos de los cultivos en biorreactor.....	48
6.4.6.1. Determinación de crecimiento celular (densidad celular y velocidad específica de crecimiento).....	48
6.4.6.2. Determinación de producción extracelular de fitasa y productividad volumétrica extracelular.....	49
6.4.6.3. Determinación de rendimiento celular proveniente del glicerol ( $Y_{x/s}$ ).....	49
6.4.6.4. Determinación de rendimiento de producción extracelular de fitasa/biomasa ( $Y_{p/x}$ ) .....	49
6.4.6.5. Determinación de rendimiento de producción extracelular de fitasa proveniente de glicerol ( $Y_{p/s}$ ).....	49
6.5. Determinación del impacto del proceso de optimización en la respuesta fisiológica del hospedero a condiciones de alta y baja productividad volumétrica de la proteína recombinante FTEII. ....	50
6.5.1. Selección de genes y diseño de oligonucleótidos específicos. ....	50
6.5.2. Preparación de RNA total de muestras de células obtenidas de los cultivos de alta y baja productividad volumétrica extracelular de fitasa.....	51
6.5.3. Ensayos de qPCR para determinar la eficiencia y el intervalo de linealidad de los genes seleccionados.....	54
6.5.4. Determinación de los niveles de expresión de los genes seleccionados en los cultivos de alta y baja productividad volumétrica de fitasa extracelular .....	58
6.5.5. Comparación de los niveles de expresión de los genes seleccionados con la respuesta fisiológica del hospedero.....	60
6.5.6. Análisis estadístico .....	60
6.6. Construcción de cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> portadoras del gen heterólogo <i>FTEII</i> regulado por el promotor <i>GAP</i> .....	61
6.6.1. Obtención de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> JM109 pGAHFTEIV y pGEMFTEIIaox .....	61
6.6.2. Construcción del plásmido pGAHFTEII y transformación en <i>E. coli</i> TOP10.....	63
6.6.3. Preparación a mediana escala del plásmido pGAHFTEII y transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 .....	69
6.6.4. Caracterización genotípica de las cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> KM71GAHFTEII.....	71
6.7. Selección de cepas de <i>P. pastoris</i> sobreproductoras de la proteína recombinante FTEII regulada por el promotor <i>GAP</i> .....	71



6.7.1. Cultivos en tubo agitado .....	71
6.7.2. Cultivos en matraz .....	74
6.8. Optimización de cuatro factores que constituyen las condiciones de cultivo para incrementar la productividad volumétrica extracelular .....	75
6.8.1. Diseño del proceso de optimización empleando el método simplex secuencial . .....	75
6.8.2. Comportamiento de parámetros fisiológicos de los cultivos en biorreactor ...	76
6.8.2.1. Crecimiento celular y consumo de glicerol.....	76
6.8.2.2. Producción de fitasa extracelular .....	78
6.8.2.3. Comportamiento de los tres rendimientos $Y_{x/s}$ , $Y_{p/x}$ y $Y_{p/s}$ durante el proceso de optimización .....	79
6.8.2.4. Comportamiento de las condiciones de cultivo durante el proceso de optimización.....	80
6.9. Determinación el impacto del proceso de optimización en la respuesta fisiológica del hospedero a condiciones de alta y baja productividad volumétrica de la proteína recombinante FTEII .....	81
6.9.1. Selección de genes y diseño de oligonucleótidos específicos .....	81
6.9.2. Preparación de RNA total de muestras de células obtenidas de los cultivos de alta y baja productividad volumétrica extracelular de fitasa.....	85
6.9.3. Ensayos de qPCR para determinar la eficiencia de amplificación y el intervalo de linealidad de los genes seleccionados .....	88
6.9.4. Determinación de los niveles de expresión de los genes seleccionados en los cultivos de alta y baja productividad volumétrica de fitasa extracelular .....	89
6.9.5. Comparación de los niveles de expresión de los genes seleccionados con la respuesta fisiológica del hospedero.....	94
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>97</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>108</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>109</b>
<b>APÉNDICES</b> .....	<b>110</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>113</b>
<b>RESUMEN BIOGRÁFICO</b> .....	<b>122</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>P. pastoris</i> utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes. ..4	4
Tabla 2. Vectores de expresión empleados para la producción de proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i> . ....5	5
Tabla 3. Estudios realizados en <i>P. pastoris</i> empleando el promotor <i>GAP</i> ..... 14	14
Tabla 4. Mezcla de reacción de la digestión enzimática con <i>XhoI</i> y <i>NotI</i> de los plásmidos pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX .....27	27
Tabla 5. Mezcla de reacción para la caracterización por PCR de pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV .....28	28
Tabla 6. Condiciones del ensayo de PCR .....28	28
Tabla 7. Mezcla de reacción de la digestión preparativa de pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX con <i>XhoI</i> y <i>NotI</i> .....29	29
Tabla 8. Componentes de la reacción de ligación del fragmento <i>FTEII</i> con el vector pGAH. ....30	30
Tabla 9. Mezcla de reacción de la digestión enzimática con <i>XhoI</i> y <i>NotI</i> de los plásmidos pGAHFTEII .....32	32
Tabla 10. Mezcla de reacción para la caracterización por PCR de pGAHFTEII .....33	33
Tabla 11. Condiciones del ensayo de PCR .....33	33
Tabla 12. Componentes y volúmenes de la digestión preparativa de pGAHFTEII con <i>Sall</i> . ....34	34
Tabla 13. Volúmenes de la mezcla de reacción para la verificación de la integración del cassette de expresión de las clonas transformantes. ....37	37
Tabla 14. Concentración de los estándares de ASB para la recta de calibración.....38	38
Tabla 15. Volúmenes para la preparación de los estándares para la curva de calibración. ....40	40
Tabla 16. Mezcla de reacción para la determinación de actividad de fitasa .....41	41
Tabla 17. Condiciones de los cinco cultivos iniciales del diseño simplex.....44	44
Tabla 18. Cultivos finales del simplex con condiciones de cultivo optimizadas .....44	44
Tabla 19. Mezcla de reacción para el tratamiento del RNA con RQ1 DNasa libre de RNasa. ....53	53
Tabla 20. Condiciones para el ensayo de DNasa. ....53	53
Tabla 21. Mezcla de reacción para la síntesis de DNAc (1 preparación). ....54	54
Tabla 22. Condiciones del ensayo de síntesis de DNAc. ....54	54
Tabla 23. Condiciones del ensayo de qPCR para SYBR Green .....55	55
Tabla 24. Volúmenes de la mezcla de reacción para los ensayos de qPCR para la recta de eficiencia de amplificación con SYBR Green con todos los oligonucleótidos en estudio, excepto <i>GAP</i> y <i>FTEII</i> . ....56	56
Tabla 25. Volúmenes de la mezcla de reacción para los ensayos de qPCR para las rectas de eficiencia de amplificación con las sondas de hidrólisis para el gen <i>GAP</i> y <i>FTEII</i> ....57	57
Tabla 26. Condiciones del ensayo de qPCR utilizando sondas de hidrólisis.....57	57
Tabla 27. Volúmenes de mezcla de reacción para los ensayos de qPCR con SYBR Green de los 19 genes en estudio en las muestras obtenidas de los cultivos A y G. ....59	59

Tabla 28. Volúmenes de mezcla de reacción para los ensayos de qPCR con sondas de hidrolisis ( <i>GAP</i> y <i>FTEII</i> ) de las muestras obtenidas de los cultivos A y G.....	59
Tabla 29. Producción, producción volumétrica y productividad volumétrica extracelular de fitasa de cada cultivo realizado. ....	75
Tabla 30. Genes seleccionados y secuencia de oligonucleótidos específicos.....	84
Tabla 31. Análisis de la formación de estructuras secundarias de tipo horquilla, homodímero y heterodímero de las secuencias de los oligonucleótidos diseñados.....	85
Tabla 32. Concentración y calidad de las muestras de RNA obtenidas de diferentes tiempos de los cultivos A y G en la etapa de lote alimentado con glicerol, previo al tratamiento con DNAsa.....	87
Tabla 33. Concentración y calidad de las muestras de RNA obtenidas de diferentes tiempos de los cultivos A y G en la etapa de lote alimentado con glicerol, posterior al tratamiento con DNAsa.....	87
Tabla 34. Eficiencia, linealidad, intervalos de linealidad de los genes evaluados.....	89
Tabla 35. Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ) media, y CV (%) de cada uno de los genes evaluados en cuatro muestras correspondientes al cultivo A.....	90
Tabla 36. Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ) media, y CV (%) de cada uno de los genes evaluados en cuatro muestras correspondientes al cultivo G.....	91
Tabla 37. Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ) media, y CV (%) de cada uno de los genes evaluados en las muestras correspondientes al tiempo final en el cultivo A y G. ....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la vía de secreción en levaduras..	10
Figura 2. Estrategia general para la determinación de la respuesta fisiológica de cepas de <i>P. pastoris</i> en condiciones optimizadas de cultivo para la sobreproducción de proteínas recombinantes.	25
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de preparaciones de DNA plasmídico a mediana escala de pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV.	61
Figura 4. . Electroforesis en geles de agarosa al 0.8% del análisis de restricción con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>NotI</i> . de pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV	62
Figura 5. Electroforesis en geles de agarosa al 0.8% del ensayo de PCR para la caracterización de los plásmidos pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV.	63
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la digestión preparativa de pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV con <i>XhoI</i> y <i>NotI</i> .	64
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de los fragmentos purificados para llevar a cabo la ligación.	64
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la ligación del vector pGAH con el fragmento <i>FTEII</i> .	65
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de pGAHFTEII.	66
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización enzimática del plásmido pGAHFTEII con <i>XhoI</i> y <i>NotI</i> .	67
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización por PCR con los iniciadores pGAPF y 3AOX del plásmido pGAHFTEII construido.	68
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización por PCR con los iniciadores FTE1 y FTE2 del plásmido pGAHFTEII construido.	68
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de preparaciones de DNA plasmídico a mediana escala de pGAHFTEII.	69
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de la digestión enzimática con la enzima <i>SalI</i> .	70
Figura 15. Electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en TBE 1X de DNA genómico aislado de cepas de <i>P. pastoris</i> KM71 transformadas con el vector pGAHFTEII. I.	70
Figura 16. . Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización por PCR con los iniciadores pGAPF y FTE2 del DNA genómico aislado de las colonias de cepas KM71GAHFTEII.	71
Figura 17. Crecimiento celular de 151 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71GAHFTEII en medio BMG-CaCl <sub>2</sub> a las 30 h de cultivo, ordenadas de mayor a menor densidad celular.	72
Figura 18. Concentración de proteínas extracelulares de 151 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71GAHFTEII en medio BMG-CaCl <sub>2</sub> a las 30 h de cultivo, ordenadas de mayor a menor.	73
Figura 19. Rendimiento proteínas extracelulares/biomasa de 151 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71GAHFTEII en medio BMG-CaCl <sub>2</sub> a las 30 h de cultivo, ordenadas de mayor a menor.	73

Figura 20. Concentración de proteínas extracelulares, densidad celular y $Y_{p/x}$ de cinco clonas de <i>P. pastoris</i> KM71GAHFTEII en medio BMG-CaCl <sub>2</sub> a las 30 h de cultivo, ordenadas de mayor a menor $Y_{p/x}$ .....	74
Figura 21. Productividad volumétrica de fitasa extracelular de los cultivos de los siete cultivos con la cepa KM71GAHFTEII. ....	76
Figura 22. Crecimiento celular a lo largo del tiempo de cultivo en los siete cultivos realizados.....	77
Figura 23. Perfil de alimentación exponencial de glicerol en los siete cultivos realizados.. .....	77
Figura 24. Producción de fitasa extracelular a lo largo del tiempo de cultivo en los siete cultivos realizados. ....	78
Figura 25. Producción de proteínas extracelulares a lo largo del tiempo de cultivo en los siete cultivos realizados. ....	79
Figura 26. Rendimiento celular proveniente del glicerol, $Y_{x/s}$ ; rendimiento de producción extracelular de fitasa/biomasa, $Y_{p/x}$ ; y rendimiento de producción extracelular de fitasa proveniente de glicerol, $Y_{p/s}$ durante el proceso de optimación. Los cultivos están ordenados de menor a mayor productividad volumétrica extracelular de fitasa.....	80
Figura 27. Comportamiento de las condiciones de cultivo durante el proceso de optimación.....	81
Figura 28. Alineamientos en blastn de los oligonucleótidos diseñados con su secuencia blanco correspondiente en el genoma de <i>P. pastoris</i> .....	83
Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X de preparaciones de RNA total de 10 muestras correspondientes a los cultivos A y G. ....	86
Figura 30. Electroforesis digital de preparaciones de RNA total de 10 muestras correspondientes a los cultivos A y G.....	86
Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X de preparaciones de RNA total tratado con DNAsa de 10 muestras correspondientes a los cultivos A y G.....	86
Figura 32. Curva de disociación para los genes seleccionados expresada como la derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura, donde solo se observa un pico para cada gen utilizando cDNA de la muestra calibradora (tiempo 0 de la etapa de lote alimentado del cultivo G). ....	88
Figura 33. Niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo de glicerol, traducción y la ruta de secreción de proteínas en el cultivo A. Valores de expresión relativa obtenidos a diferentes tiempos del cultivo. ....	93
Figura 34. Niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo de glicerol, traducción y la ruta de secreción de proteínas en el cultivo G. Valores de expresión relativa obtenidos a diferentes tiempos del cultivo. ....	93
Figura 35. Comparación de los niveles de expresión relativa de 19 genes que participan en el metabolismo de glicerol, traducción, translocación, UPR, ERAD, glicosilación, autofagia, exocitosis y el gen heterólogo en los cultivos A y G. ....	96
Figura 36. Curvas de amplificación de los cultivos A y G. Sólo se muestran de algunos genes.....	111

Figura 37. Correlación de los valores del ciclo umbral (Ct) respecto al logaritmo de la cantidad equivalente de RNA, obtenida a partir de las curvas de amplificación de los genes generadas a partir de diluciones seriadas del cDNA correspondiente al tiempo 0. Solo se muestran algunos genes.....112

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
AOX	Alcohol oxidasa
<i>AOX1</i>	Gen codificante para la AOX1
ASB	Albúmina sérica Bovina
BMG	Medio mínimo amortiguado, adicionado con glicerol
C <sub>T</sub>	Ciclo umbral de fluorescencia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
DO <sub>600 nm</sub>	Densidad óptica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
<i>et al.</i>	Et alii (y otros)
g	Número de veces la fuerza gravitacional
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
h	horas
His <sup>+</sup>	Fenotipo <i>HIS4</i> positivo
<i>HIS4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa
<i>his4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa defectuoso o mutado
kb	Kilobase = Mil pares de bases
kDa	Kilodaltones
Kex2	Serin-proteasa dependiente de Ca <sup>2+</sup> unida a membrana
KM71FTEII	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de una fitasa termoestable
KM71GAHFTEII	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de una fitasa termoestable regulada por el promotor constitutivo <i>GAP</i>
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
M	Marcador de peso molecular o concentración expresada en molar
mA	Miliamperes
mg	Miligramos
mg/L	Miligramos por litro
mg/mL	Miligramos por mililitro
min	Minutos
mM	Concentración milimolar
Mut <sup>s</sup>	Mutante que carece del gen <i>AOX1</i> funcional
NCBI	National Center of Biotechnology Information
ng	Nanogramos
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de iones hidrógeno

qPCR	Quantitative polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
RDB His <sup>-</sup>	Medio de regeneración básico de dextrosa sin histidina
RE	Retículo endoplásmico
RIN	Número de integridad de RNA
<i>RNAse</i>	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Reverse transcription (Transcripción reversa)
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<i>Taq</i> polimerasa	DNA polimerasa obtenida de <i>Thermophilus aquaticus</i> . Enzima encargada de construir nuevas cadenas de DNA
TE	Amortiguador de pH Tris-EDTA
Tris	Trizma o tris (hidroximetil) aminometano
TSNT	Tritón-SDS-NaCl-Tris-Cl
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas o no plegadas
UV	Radiación ultravioleta
X	Número de veces la concentración
YNB	Base nitrogenada de levadura
YPD	Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y dextrosa



## LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo de la absorbancia generada por el fosfato liberado en la mezcla de reacción .....	41
Ecuación 2. Calculo de fosfato libre (mM).....	42
Ecuación 3. Cálculo de la actividad volumétrica de fitasa en la muestra .....	42
Ecuación 4. Método Simplex secuencial (reflexión) para obtener nuevos valores de cada factor para las nuevas condiciones de cultivo. ....	44
Ecuación 5. Perfil exponencial de la adición de glicerol .....	47
Ecuación 6. Calculo del flujo inicial de adición (mL/min).....	47
Ecuación 7 .Cálculo de biomasa. ....	48
Ecuación 8. Cálculo de la expresión relativa incluyendo eficiencias de amplificación y factores de dilución. ....	110

## RESUMEN

Generalmente, la inducción del gen heterólogo en *Pichia pastoris* se realiza con el promotor *AOXI* y metanol. Sin embargo, el riesgo que implica el uso del metanol y la complejidad del control del proceso a nivel industrial ha dado a lugar a buscar promotores alternativos. Uno de ellos es el promotor *GAP* que regula la expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de forma constitutiva. La optimización de las condiciones de cultivo ha demostrado que también influye en la producción de la proteína heteróloga e impacta en la fisiología de la levadura, siendo el propósito del presente trabajo determinar la respuesta fisiológica de cepas de *Pichia pastoris* a condiciones de sobreproducción de proteínas heterólogas reguladas por un promotor constitutivo. Se construyó el vector pGAHFTEII, se transformaron células de *P. pastoris* KM71, se seleccionaron por auxotrofia a histidina y se verificó la integración del casete de expresión en el genoma de la levadura por PCR. Se seleccionó la cepa sobreproductora de la proteína recombinante. Se diseñaron y realizaron 7 experimentos empleando el método Simplex con combinaciones de dos niveles cada uno de los cuatro factores ambientales a optimizar: concentración inicial de la fuente de carbono y temperatura, pH y velocidad específica de crecimiento en la etapa de lote alimentado con glicerol, con el fin de incrementar la productividad volumétrica extracelular de fitasa en un biorreactor de 7 L empleando la cepa seleccionada. Se determinaron los niveles relativos de expresión de los genes *FTEII*, *GAP*, *RPS8A*, *RPS26B*, *GUT1*, *DAK2*, *PGK*, *SEC63*, *CPR5*, *PRE5*, *BET2*, *COPI*, *ATG4*, *ATG8*, *MPG1*, *PMT2*, *KAR2*, *RSP5*, *SSO2*, *G6PD* y *YPT1* a lo largo del tiempo de dos cultivos (A: baja, G: alta productividad volumétrica) por RT-qPCR mediante el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Se obtuvieron más de 200 clonas His<sup>+</sup> y todas las clonas analizadas por PCR mostraron una única banda de 1310 pb. La clona seleccionada como sobreproductora de fitasa mostró un rendimiento proteínas/biomasa 16 veces mayor con respecto a la que obtuvo el menor rendimiento de las 151 clonas analizadas y un  $Y_{p/x}$  3.4 veces mayor que el cultivo de menor  $Y_{p/x}$  de los cultivos de 50 mL realizados. Se incrementó 1.6 veces la productividad volumétrica extracelular de fitasa con respecto al cultivo de menor productividad volumétrica extracelular y se incrementó 5.3 veces el  $Y_{p/s}$  con respecto al cultivo de menor  $Y_{p/s}$  de los cultivos derivados del método Simplex. El proceso de optimización generó un aumento de los tres rendimientos ( $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/x}$ ,  $Y_{p/s}$ ). El presente trabajo no solo trata de la construcción y selección de una cepa sobreproductora de *P. pastoris* regulada por el promotor *GAP* y la optimización de las condiciones de cultivo, sino que también contribuye al entendimiento del impacto de las condiciones de cultivo en la respuesta fisiológica del huésped. La disminución de la temperatura y de la velocidad específica de crecimiento resultaron ser los factores que más influyeron en el aumento del  $Y_{p/x}$  y por lo tanto en la eficiencia celular para producir la fitasa recombinante de forma extracelular. Además, los resultados obtenidos sugieren que la producción y productividad de fitasa extracelular no se vio afectada por la transcripción ni la traducción del gen *FTEII* durante el proceso de optimización, sino que la optimización de las condiciones de cultivo conduce a un proceso de secreción mejorado. Los resultados de expresión de genes sugieren que en los cultivos con  $\mu$  cercanos a la  $\mu_{max}$  y temperatura más alta (30°C), las moléculas de proteína recombinante sintetizadas llegan al retículo endoplásmico donde probablemente no se pueden plegar por completo, lo que activa la respuesta UPR, pero debido a la saturación del sistema derivado de la generación de biomasa, la proteína recombinante sobrepasa el control de calidad del retículo endoplásmico sin importar su estado de plegamiento, pasando por el sistema de tráfico de vesículas para dirigirse al aparato de Golgi. En este punto, probablemente, la proteína es devuelta al retículo endoplásmico por el sistema COPI y es enviada a degradación por el mecanismo ERAD. La fracción de moléculas de proteína plegadas correctamente continúa en la ruta de secreción. En contrapartida, en el cultivo G (menor velocidad específica y temperatura) las moléculas de proteína recombinante sintetizadas llegan al retículo endoplásmico donde probablemente el plegamiento es más eficiente que en el cultivo A, lo que les permite pasar por el sistema de tráfico de vesículas para dirigirse al aparato de Golgi y que sólo una pequeña fracción se regrese al retículo endoplásmico quedando la mayor parte de la proteína recombinante en la ruta de secreción con glicosilación (manosilación) en el aparato de Golgi y secreción final por exocitosis, todo esto apoyado por el mecanismo de recambio de proteico activado que ayuda a la síntesis de la proteína recombinante.

## ABSTRACT

Generally, the induction of the heterologous gene in *Pichia pastoris* is performed with the *AOX1* promoter and methanol. However, the risk involved in the use of methanol and the complexity of process control at the industrial level has led to the search for alternative promoters. One of them is the *GAP* promoter that regulates the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase constitutively. The optimization of the culture conditions has shown that it also influences the production of the heterologous protein and impacts on the physiology of the yeast, being the aim of the present work to determine the physiological response of *Pichia pastoris* strains to conditions of overproduction of heterologous proteins regulated by a constitutive promoter. The pGAHFTEII vector was constructed, *P. pastoris* KM71 cells were transformed and were selected by histidine auxotrophy and the integration of the expression cassette into the yeast genome was verified by PCR. The overproducer strain of the recombinant protein was selected. Seven experiments were designed and performed using the Simplex method with combinations of two levels each of the four environmental factors to be optimized: initial concentration of the carbon source and temperature, pH and specific growth rate in the fed-batch step with glycerol, in order to increase the extracellular volumetric productivity of phytase in a 7 L bioreactor using the selected strain. The relative expression levels of the *FTEII*, *GAP*, *RPS8A*, *RPS26B*, *GUT1*, *DAK2*, *PGK*, *SEC63*, *CPR5*, *PRE5*, *BET2*, *COPI*, *ATG4*, *ATG8*, *MPG1*, *PMT2*, *KAR2*, *RSP5*, *SSO2*, *G6PD* and *YPT1* over the time of two culture conditions (A: low, G: high volumetric productivity) by RT-qPCR using the relative quantification method  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . More than 200 His<sup>+</sup> clones were obtained and all clones analyzed by PCR showed a single band of 1310 bp. The clone selected as a phytase overproducer showed a protein/biomass yield 16 times higher compared to the one that obtained the lowest yield of the 151 clones analyzed and a  $Y_{p/x}$  3.4 times higher than the clone with the lower  $Y_{p/x}$  of the cultures of 50 mL performed. The phytase extracellular volumetric productivity was increased 1.6 times with respect to the culture of lower extracellular volumetric productivity and the  $Y_{p/s}$  was increased 5.3 times with respect to the crop of lower  $Y_{p/s}$  of the cultures derived from the Simplex method. The optimization process generated an increase of the three yields ( $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/x}$ ,  $Y_{p/s}$ ). The present work not only deals with the construction and selection of an overproductive strain of *P. pastoris* regulated by the *GAP* promoter and the optimization of culture conditions, but also contributes to the understanding of the impact of culture conditions on the physiological response of the host. The decrease in temperature and the specific growth rate turned out to be the factors that most influenced the increase in  $Y_{p/x}$  and therefore in cellular efficiency to produce recombinant phytase extracellularly. In addition, the results obtained suggest that the production and productivity of extracellular phytase was not affected by the transcription or translation of the *FTEII* gene during the optimization process, but that the optimization of culture conditions leads to an improved secretion process. Gene expression results suggest that in cultures with  $\mu$  close to  $\mu_{max}$  and higher temperature (30° C), the synthesized recombinant protein molecules reach the endoplasmic reticulum where they probably cannot be completely folded, which activates the UPR response, but due to the saturation of the system derived from the generation of biomass, the recombinant protein exceeds the quality control of the endoplasmic reticulum regardless of its folding state, passing through the vesicle traffic system to go to the Golgi apparatus. At this point, probably, the protein is returned to the endoplasmic reticulum by the COPI system and is sent to degradation by the ERAD mechanism. The fraction of correctly folded protein molecules continues in the secretion path. In contrast, in the G culture (lower specific speed and temperature) the synthesized recombinant protein molecules reach the endoplasmic reticulum where the folding is probably more efficient than in the A culture, which allows them to pass through the vesicle traffic system to go to the Golgi apparatus and only a small fraction is returned to the endoplasmic reticulum, leaving most of the recombinant protein in the secretion pathway with glycosylation (mannosylation) in the Golgi apparatus and final secretion by exocytosis, all supported by the replacement mechanism of activated protein that helps the synthesis of recombinant protein

## 1. INTRODUCCIÓN

*P. pastoris* es un hospedero ampliamente utilizado como parte de un sistema de expresión para la producción de proteínas heterólogas; debido a que se distingue principalmente por su rápido crecimiento a altas densidades celulares, la disponibilidad de fuertes promotores regulables e inducibles y por la posibilidad de producir grandes cantidades de proteínas recombinantes por litro de cultivo tanto intracelular como extracelularmente.

La regulación de la expresión de los genes de interés se lleva a cabo por promotores sensibles a fuentes de carbono específicas empleadas como sustrato. El promotor más usado para transcribir genes heterólogos en *P. pastoris* proviene del gen de la enzima alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *P. pastoris*, cuya expresión está regulada por metanol. Sin embargo, la expresión constitutiva facilita la manipulación proceso, omite el uso de inductores potencialmente peligrosos y proporciona la transcripción continua del gen de interés; además estrategias de ingeniería metabólica podrían tomar ventaja adicional de promotores constitutivos para garantizar un flujo controlado de metabolitos. La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima clave en la glicólisis, su promotor (*GAP*) provee una fuerte expresión constitutiva en glucosa y glicerol que no requiere de inductor.

La producción de proteínas recombinantes es frecuentemente potenciada a nivel de transcripción, uso de codones preferenciales, plegamiento de proteínas, y secreción. Sin embargo, la sobreproducción de proteínas recombinantes afecta directamente el metabolismo primario de las células. A pesar del conocimiento del impacto que las condiciones de cultivo tienen en la producción de la proteína heteróloga en *P. pastoris*, estos están pobremente caracterizados. Por esta razón, en el presente trabajo se evaluará el empleo del promotor GAP con el fin de producir, de forma extracelular, altos niveles de expresión de una fitasa termoestable (FTEII), y se analizarán mecanismos moleculares que puedan afectar la producción del producto recombinante. Este estudio proporcionará información importante que permita relacionar el efecto del gen heterólogo, las condiciones de cultivo, la respuesta fisiológica en la producción del producto recombinante.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Producción de proteínas recombinantes

En las últimas décadas, desde que los científicos aprendieron y lograron como manipular DNA para identificar, mover y colocar genes en organismos diferentes de la fuente original, se ha establecido y desarrollado la industria biotecnológica. Esto ha permitido la producción comercial de enzimas industriales y proteínas biofarmacéuticas (Weinacker *et al.*, 2013). En el año 2012, el 25% de los productos farmacéuticos comerciales eran de origen biológico (Martínez *et al.*, 2012), de los cuales sus ventas excedieron los 100 billones de dólares. En conjunto con la producción de proteínas industriales, el mercado de producción de proteínas recombinantes se espera que incremente de manera anual en un 6.5% para el periodo del 2019-2024.

El alcanzar una producción competitiva de proteínas recombinantes no es sencillo, pues los procesos industriales deben producir la mayor cantidad de producto en el menor tiempo posible a bajo costo, por lo que generalmente, el desarrollo de un nuevo proceso o producto requiere de la elección de un hospedero adecuado para la producción (Porro *et al.*, 2011).

La industria biotecnológica ha empleado numerosos organismos, bacterianos y eucarióticos como plataformas de producción. Las bacterias tienen ventajas como son crecimiento rápido, el cultivo en medios de bajo costo y fácil manipulación genética. Sin embargo, los sistemas de expresión bacterianos tradicionales tienen algunas limitaciones para la producción de proteínas recombinantes, debido a su incapacidad de realizar modificaciones postraduccionales complejas (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). Estas limitaciones se han superado al emplear sistemas de expresión eucarióticos y algunos de ellos se emplean actualmente para la producción a gran escala de diferentes proteínas, entre los cuales se encuentran: hibridomas, células CHO (Chinese hamster ovary), células de insecto y levaduras (Nolan y Lee 2012; Morrow 2007; Cox 2012; Çelik y Çalık 2012), donde los primeros dos tienen gran similitud con células humanas, por lo que las proteínas producidas generalmente son plegadas y modificadas adecuadamente. Sin embargo, sus costos de cultivo son elevados, tienen capacidad limitada de secreción y los rendimientos de la proteína producida son bajos (Demain y Vaishnav 2009).

Por otro lado, los sistemas de expresión de levaduras como los de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Kluyveromyces lactis*, tienen la ventaja de que todos son organismos GRAS (generalmente reconocidos como seguros), su genoma se encuentra secuenciado, realizan modificaciones postraduccionales, y producen grandes cantidades de proteína heteróloga en poco tiempo. (Kim *et al.*, 2015; Ahmad *et al.*, 2014).

## **2.2. *Pichia pastoris* como organismo modelo para la producción de proteínas recombinantes**

*P. pastoris* es una levadura conocida por su capacidad de usar el metanol como única fuente de carbono y por su uso para la producción de proteínas heterólogas. Su uso se ha extendido durante los últimos años debido a que posee ciertas características como son: 1) tiene un manejo fácil y es de rápido crecimiento, 2) posee promotores fuertes y finamente regulados, 3) tiene la habilidad de producir y secretar altos niveles de proteínas heterólogas, 4) su capacidad de realizar modificaciones postraduccionales, 5) su preferencia por el crecimiento aerobio sobre el fermentativo, 6) tiene estabilidad génica. Últimamente ha sido estudiado como organismo modelo para determinar las rutas metabólicas implicadas en la asimilación de metanol, como modelo eucariote para el estudio de la biogénesis de peroxisomas y como organismo modelo para el desarrollo de modelos metabólicos de organismos empleados en la producción de proteínas heterólogas (Cregg *et al.*, 1985; Zhang *et al.*, 2008; Sohn *et al.*, 2010).

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

El sistema de expresión de genes heterólogos en *P. pastoris* está basado en vectores y cepas modificadas que son capaces de transformarse integrando el vector en su genoma de manera sitio-dirigida (Cereghino y Cregg, 2000).

#### **2.2.1.1. Cepas de *P. pastoris* empleadas para la producción de proteínas recombinantes**

Todas las cepas de *P. pastoris* que son empleadas como sistemas de expresión, son derivadas de la cepa NRRL-Y 11430 y de la X-33. Muchas de estas cepas tienen una mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*) que permite la selección por

auxotrofia a histidina de las clonas que adquirieron el gen funcional después de la transformación. Para evitar la proteólisis de las proteínas heterólogas en los sistemas de producción de *P. pastoris*, se han desarrollado cepas modificadas como la SMD1165 ( $\Delta his4 \Delta prb1$ ) y SMD1168 ( $\Delta his4 \Delta pep4$ ) para ser deficientes en proteasas (Tabla 1) (Higgins y Cregg, 1998).

**Tabla 1.** Cepas de *P. pastoris* utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes.

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Fuente</b>
<b>Cepas wild-type</b>			
CBS7435 (NRRL Y-11430)	<i>WT</i>	WT	Centraalbureauvoor Schimmelcultures
X-33	<i>WT</i>	WT	LifeTechnologies™
<b>Cepas autotróficas</b>			
GS115	<i>his4</i>	His <sup>-</sup>	LifeTechnologies™
PichiaPink™	<i>ade2</i>	Ade <sup>-</sup>	LifeTechnologies™
KM71	<i>his4, aox1::ARG4, arg4</i>	His <sup>-</sup> , Mut <sup>S</sup>	LifeTechnologies™
KM71H	<i>aox1::ARG4, arg4</i>	Mut <sup>S</sup>	LifeTechnologies™
<b>Cepas deficientes en proteasas</b>			
SMD1165	<i>his4 prb1</i>	His <sup>-</sup>	LifeTechnologies™
SMD1168	<i>his4 pep4::URA3 ur</i>	His <sup>-</sup>	LifeTechnologies™
SMD1168H	<i>pep4</i>		LifeTechnologies™

### 2.2.1.2. Vectores de expresión empleados en el sistema de expresión de *P. pastoris*

Los vectores de expresión diseñados para la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* comparten varias características tales como una secuencia promotora, un terminador transcripcional (que dirige el procesamiento y la poliadenilación de los RNAm) y entre ellos uno o varios sitios de clonación para la inserción del gen heterólogo. Además, algunos de estos vectores incluyen el gen *HIS4* de *P. pastoris* como marcador de selección por auxotrofia a histidina o incluyen genes de resistencia a antibióticos (Kanamicina o Zeocina). Así mismo, estos vectores incluyen secuencias para la replicación en bacterias (Tabla 2) (Higgins y Cregg, 1998).

La clonación del gen heterólogo en los vectores de expresión de *P. pastoris* generalmente se lleva a cabo en *Escherichia coli*, por lo que los vectores de *P. pastoris* son de tipo lanzadera, porque tienen orígenes de replicación de *E. coli*, además poseen marcadores de selección para la transformación del vector en ambos organismos. Para la

secreción de proteínas heterólogas, algunos de los vectores de expresión contienen secuencias codificantes para una señal de secreción, esta puede ser la secuencia prepro del factor  $\alpha$  ( $\alpha$ -MF) de *Saccharomyces cerevisiae* o la secuencia señal de la fosfatasa ácida de *P. pastoris* (PHO1) (Li *et al.*, 2007).

El promotor más usado en los vectores de expresión es el promotor del gen de la enzima alcohol oxidasa 1 (AOX1) ya que es un promotor fuerte y bien regulado que es totalmente reprimido en presencia de glicerol e inducido por metanol (Çalik *et al.*, 2015).

Además del promotor *AOX1*, también se ha reportado el uso del promotor *GAP* (del gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como promotor alternativo al sistema inducible con metanol. Estudios realizados sobre el promotor *GAP* de *P. pastoris* indican que éste promueve una fuerte expresión constitutiva en glucosa a un nivel comparable al que se observa con el promotor de *AOX1* (Waterham *et al.*, 1997).

**Tabla 2.** Vectores de expresión empleados para la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*.

<b>Vectores de expresión</b>	<b>Marcador de selección</b>	<b>Características</b>
pPIC3K	<i>HIS4</i> y <i>kan<sup>r</sup></i>	Sitio múltiple de clonación; selección de cepas multicopias con G418.
pPICZ	<i>ble<sup>r</sup></i>	Sitio múltiple de clonación; selección de cepas multicopias con Zeocina; fusión de la proteína heteróloga con etiqueta de His <sub>6</sub> .
pGAPZ	<i>ble<sup>r</sup></i>	Promotor GAP, sitio múltiple de clonación, selección por Zeocina, fusión de la proteína heteróloga con etiqueta de His <sub>6</sub> .
pPIC9	<i>HIS4</i>	Promotor AOX1 acoplado a factor de secreción $\alpha$ -MF, sitios <i>XhoI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> , <i>SnaBI</i> y <i>AvrII</i> para inserción.
pPICZ $\alpha$	<i>ble<sup>r</sup></i>	Promotor AOX1 acoplado a factor de secreción $\alpha$ -MF, sitio múltiple de restricción, generación de multicopias, selección por Zeocina, fusión de la proteína heteróloga a una cola de His <sub>6</sub> .
pGAPZ $\alpha$	<i>ble<sup>r</sup></i>	Promotor GAP acoplado a factor de secreción $\alpha$ -MF, sitio múltiple de restricción, selección por Zeocina, fusión de la proteína heteróloga a una cola de His <sub>6</sub> .



### **2.2.1.3. Promotores empleados en los sistemas de expresión en *P. pastoris***

#### **2.2.1.3.1. El promotor *AOXI***

Como ya se mencionó, el promotor *AOXI* es un promotor muy fuerte y al mismo tiempo directamente controlado simplemente cambiando la fuente de carbono, y es el más comúnmente utilizado para la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. Los niveles más altos expresión de proteínas heterólogas reportados en *P. pastoris* se han logrado con el promotor *AOXI* (hasta 22 g/L y 15 g/L, intracelular y secretada, respectivamente) (Vogl y Glieder, 2013; Hasslacher *et al.*, 1997; Werten *et al.*, 1999).

Pese a que se tienen altos rendimientos empleando el promotor *AOXI*, el uso de metanol resulta ser peligroso y su manejo en grandes volúmenes es costoso, además genera una alta demanda de oxígeno durante el cultivo que puede llegar a limitar el crecimiento celular, por lo que la búsqueda de promotores alternativos se ha incrementado (Sreekrishna 2010; Çalık *et al.*, 2015).

#### **2.2.1.3.2. El promotor *GAP***

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima de unión de NAD clave en las rutas de glicólisis y gluconeogénesis. GAPDH es una proteína homotetramérica con 333 residuos de aminoácidos que tiene un peso molecular de 35,4 kDa y es expresada constitutivamente bajo el control de su promotor *GAP* (Waterham *et al.*, 1997). En los sistemas de expresión de *P. pastoris*, altos niveles de expresión pueden ser alcanzados mediante el uso del promotor *GAP*. Este promotor se ha utilizado como promotor alternativo al promotor *AOXI* debido a su expresión constitutiva, no requiere de un paso de inducción, lo que reduce el tiempo de cultivo y simplifica el proceso para la producción de proteínas. Además, se ha visto que tiene niveles de producción de proteínas similares e incluso mayores que con el sistema controlado por el promotor *AOXI* (Vogl y Glieder, 2013).

#### **2.2.1.3.3. Ingeniería de promotores**

En los últimos años, se han hecho importantes esfuerzos para desarrollar promotores que exhiban una amplia gama de actividad transcripcionales. Se han hecho bibliotecas de promotores mediante la delección y duplicación de sitios de unión de factores de

transcripción hipotéticos en la secuencia del promotor *AOX1*, de la cual se obtuvieron actividades transcripcionales desde un 6% hasta un 160% en comparación al promotor nativo (equivalente a 1.6 veces), además se realizaron caracterizaciones en condiciones de represión, activación e inducción donde se encontraron 12 elementos en cis involucrados en los altos niveles de expresión (Hartner *et al.*, 2008).

También se han hecho bibliotecas sintéticas de promotores a través de la aplicación de oligonucleótidos aleatorios y mutagénesis al azar mediante error-prone PCR (Kim *et al.*, 2014). Recientemente se hizo una biblioteca de promotores mutados a partir del promotor *GAP* por mutagénesis aleatoria para generar promotores adicionales con el potencial para la expresión génica finamente regulada o para la generación de nuevos circuitos de regulación, donde se obtuvieron variantes del promotor *GAP* cuyos niveles de expresión van desde 0.006 a 19.6 veces mayor que el promotor nativo a partir de 30,000 clonas, de las cuales siete son las que se encontraron en el intervalo (Qin *et al.*, 2011).

### **2.2.2. Metabolismo de la fuente de carbono en *P. pastoris***

La producción de proteínas recombinantes es frecuentemente potenciada a nivel de transcripción, uso de codones preferenciales, plegamiento de proteínas, y secreción. Sin embargo, la sobre-producción de proteínas recombinantes afecta directamente el metabolismo primario de las células.

*P. pastoris* puede producir energía a través de la fermentación de azúcares, alcohol-azúcares o a través de la oxidación de una gran variedad de productos de la fermentación, así como el metanol como única fuente de carbono y energía (Çalık *et al.*, 2015).

La velocidad de los procesos de transporte determina la cinética de crecimiento del microorganismo (Mattanovich *et al.*, 2009). Los carbohidratos son tomados por las células bajo cierto orden con fases de adaptación (fases lag) intermitentes, debido al conjunto de mecanismos controlados por la glucosa, desde la transcripción de los genes que codifican para los transportadores que es finamente regulado por la concentración de glucosa en el medio, además de que la presencia de glucosa tiene un impacto negativo en el metabolismo de otros carbohidratos (Çalık *et al.*, 2015).

En *P. pastoris*, la velocidad de captación de glucosa es limitada, ya que contiene menos genes transportadores de hexosa que *S. cerevisiae* y que codifican simportadores dependientes de energía, lo que se traduce a un menor rendimiento celular y del producto final. Adicionalmente *P. pastoris* tiene cuatro genes que codifican simportadores H<sup>+</sup> / glicerol hipotéticos, que son similares a transportadores de glicerol en *K. lactis* y *Yarrowia lipolytica* (Mattanovich *et al.*, 2009).

En cultivos en quimiostato de *P. pastoris* empleando glucosa, se encontró que la velocidad de captación de glucosa es de  $q_{\text{Glcmax}} = 0.35 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , 8 veces menor que la obtenida en *S. cerevisiae* ( $q_{\text{Glcmax}} = 2.88 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) a una velocidad específica de crecimiento máxima  $\mu_{\text{max}} = 0.19 \text{ h}^{-1}$ , mientras que con cultivos en glicerol, la velocidad de captación específica máxima de glicerol de *P. pastoris* es de  $q_{\text{Glycmax}} = 0.37 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , que fue significativamente mayor que la de *S. cerevisiae* ( $q_{\text{Glycmax}} = 0.046 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). La velocidad específica de crecimiento de *P. pastoris* en glicerol es de  $0.26 \text{ h}^{-1}$ ; lo que implica que el glicerol es mejor fuente de carbono para el crecimiento celular que la glucosa.

Aunque la glucosa y glicerol entran al metabolismo del carbono a través de la vía de la glicólisis, su regulación es diferente. En *S. cerevisiae*, la adición de glucosa a las células que crecieron en glicerol, resultó en un rápido cambio en el patrón de fosforilación de proteínas, así como una reestructuración masiva del estado transcripcional del genoma. Estos cambios transcripcionales implicarían un aumento de la expresión de genes responsables de la biogénesis de ribosomas y la represión de genes necesarios para la fosforilación oxidativa, y otras funciones mitocondriales y de los genes necesarios para el metabolismo inicial de azúcares distintos de la glucosa. Ya se han realizado estudios de este tipo en *P. pastoris* (Prielhofer *et al.*, 2015) y se observó que los cambios transcripcionales son muy pocos por lo que *P. pastoris* se comporta casi igual con glicerol que con glucosa.

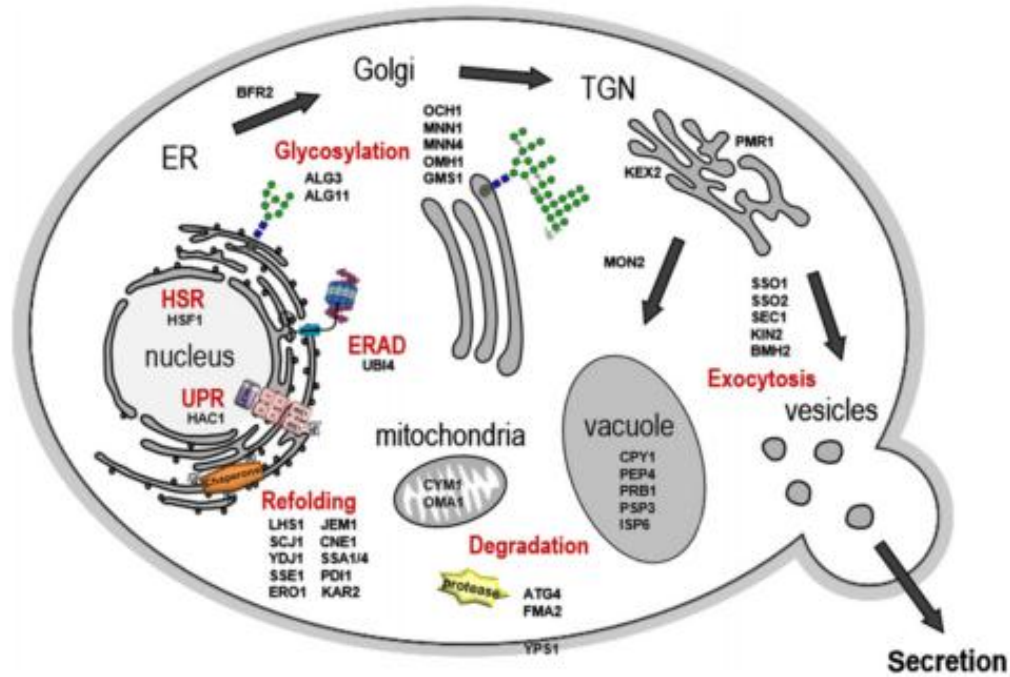
### **2.2.3. Secreción de proteínas en *P. pastoris***

La producción de proteínas secretadas requiere de varios pasos en la conversión de secuencias de DNA codificante a proteínas maduras, lo cual es un proceso complejo e involucra diferentes etapas en el procesamiento, incluyendo transcripción, traducción,

translocación, modificaciones postraduccionales como escisiones peptídicas y glicosilaciones, plegamiento y secreción (Hou *et al.*, 2012).

El proceso de secreción de proteínas inicia en el mismo momento que el RNAm se traduce y se transloca el péptido inmaduro a la membrana del retículo endoplásmico (RE) por acción del complejo multimérico SEC61-OST (genes *SEC61*, *SBH1*, *SSS1*, *STT3*, *SWP1*, *WBP1* y *OST1-6*) que además marca a la proteína con un O-oligosacárido. Posteriormente la proteína entra a la matriz del RE donde se corta el péptido señal (región “pre”) por acción del complejo enzimático señal peptidasa (genes *SPC1*, *SPC2*, *SPC3* y *SEC11*), y diversas proteínas de control de calidad y chaperonas empiezan 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 la proteína se N- y/o O-glicosila. La proteína correctamente plegada se transloca al aparato de Golgi donde los oligosacáridos enlazados sufren reducciones y adiciones de más monosacáridos a la cadena (comúnmente manosas). A su vez se remueve el péptido “pro” de la proteína por acción de la proteasa KEX2 y se empacada en una vacuola secretora para ser madurada (en algunos casos) por diversas exo y endo-proteasas (genes *PEP4*, *PRB1*, *PRC1*, *YPS1*, *YPS2*, *YPS3*, y *YPS7*, *MKC7*, *ATG4*, *GPI8*, *HSP31*, *HSP32*, *HSP33* y *SNO4*). Por último, la vacuola libera su contenido al espacio extracelular mediante exocitosis (De Schutter *et al.*, 2009).

En la Figura 1 se representa de manera esquemática la vía de secreción en levaduras, así como algunos genes que se han sobre-expresado para mejorar la secreción de las proteínas heterólogas.



**Figura 1.** Representación esquemática de la vía de secreción en levaduras. Las proteínas para ser secretadas, deben entrar por el RE, una acumulación de proteínas mal plegadas conduce a la inducción de la respuesta UPR y a ERAD. Las proteínas correctamente plegadas son transportadas al aparato de Golgi para procesamiento adicional, posteriormente las proteínas pueden ser secretadas extracelularmente o ser canalizadas hacia vacuolas para almacenaje o degradación (Kim *et al.* 2014).

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 RE. Este paso es clave debido a que un plegamiento adecuado trae como consecuencia proteínas maduras en su forma activa, por lo tanto, este paso determina en un alto grado la productividad del proceso de producción de proteínas extracelulares en *P. pastoris*. Un componente clave de este sistema es la proteína chaperona BiP (gen *KAR2*), 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 de degradación de proteosoma.

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 inglés) y la degradación de proteínas asociada a retículo endoplásmico (ERAD por sus siglas en inglés) (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 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 al núcleo de la célula. Cuando se comienzan a acumular péptidos en el RE debido al mal funcionamiento de chaperonas como BiP, la proteína sensora Ire1 se autofosforila, lo que activa un corte del RNAm del factor de transcripción del proceso UPR (gen *Hac1*) para posteriormente producirse la proteína HAC. 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 aumenta el funcionamiento del mecanismo de degradación de proteínas ERAD para desahogar el espacio del RE.

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 el proteosoma (Gasser *et al.*, 2008; Travers *et al.*, 2000), el cual es un complejo multi-protéico 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 sobreexpresa proteínas, este sistema de degradación puede aumentar su velocidad y degradar una mayor cantidad de proteínas debido a la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (Travers *et al.*, 2000).

### **2.3. Bioprocesos con *P. pastoris***

Los problemas existentes en el sistema de producción de *P. pastoris* se han abordado mediante ingeniería genética de cepas y mediante la mejora de las condiciones de cultivo en biorreactores. Generalmente, en el diseño del bioproceso se busca identificar las

condiciones óptimas (pH, temperatura, oxígeno disuelto y el suministro de nutrientes) para el crecimiento de biomasa y la formación de producto, por eso es muy importante el diseño de la estrategia de cultivo (Looser *et al.*, 2015). Como que la producción de proteínas recombinantes bajo la regulación del promotor *GAP* está asociada al crecimiento celular, la estrategia de cultivo puede llevarse a cabo mediante un cultivo en lote (batch) o bien en un cultivo en lote alimentado (fed-batch). Mientras que el cultivo en lote no es comúnmente utilizado para la producción de proteínas recombinantes debido a su baja producción, el uso de la estrategia de lote alimentado es el más usado (Tabla 3), aunque también se han empleado estrategias de cultivo continuo para la producción de proteínas recombinantes (Çalık *et al.*, 2015).

El control de las condiciones de cultivo en los bioprocesos con *P. pastoris* es un factor clave para lograr niveles altos de producción de proteínas heterólogas, y se puede llevar a cabo con tres tipos de mediciones: *in situ*, en línea y en discontinuo. Se considera una medición *in situ* si la sonda del parámetro a medir y controlar se encuentra sumergida en el medio de cultivo y tiene un tiempo de respuesta rápido para proporcionar la medición. Este tipo de mediciones es muy útil para usar una estrategia de control por retroalimentación (feed-back control), en la cual un sistema automatizado de control (controlador) toma decisiones en base a comparar el valor medido por la sonda con un valor deseado o de consigna (set point). Se recomienda que parámetros clave para el control del bioproceso, tales como la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, y a ser posible la adición de nutrientes si el bioproceso es en lote alimentado, sean controlados por este medio. Una medición en línea es aquella que se realiza con una sonda fuera de medio de cultivo, pero al lado o cerca del biorreactor y también tiene un tiempo de respuesta rápido, por lo que también es útil para usar una estrategia de control por retroalimentación. Ejemplo de estas mediciones son la determinación de la densidad óptica o la densidad celular en peso húmedo, o el empleo de espectrofotómetros en línea con el biorreactor, también algunos sistemas que permiten determinar rápidamente la concentración de la fuente de carbono en el medio de cultivo. Por último, una medición en discontinuo es aquel que se lleva a cabo para determinar parámetros que no son vitales para el control del proceso ya que se realizan por métodos que, aunque muy buenos, tardan en proporcionar la información, por lo tanto, estas mediciones no son útiles para el control

del proceso, pero sí son informativas y, pero otorgan un panorama general para las modificaciones que se deben hacer para el siguiente bioproceso. Parámetros tales como la producción de la proteína heteróloga, la actividad de algún metabolito secundario, actividad de proteasas, etc., son mediciones en discontinuo.



**Tabla 3.** Estudios realizados en *P. pastoris* empleando el promotor *GAP* donde se utilizaron diferentes estrategias de cultivo, valores de pH, temperatura (°C), fuente de carbono (g/L), velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ), producción (mg/L) densidad celular (g/L).

Proteína	Estrategia de cultivo	Condiciones de cultivo				$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Producción (mg/L)	Densidad celular (g/L)	Referencia
		Fuente de carbono	Concentración g/L	pH	Temperatura (°C)				
Fab 2F5	B	Glicerol	40	5	25	0.197	3.2	19.3	García Ortega <i>et al.</i> 2013
		Glucosa	40	5	25	0.190	2.9	12.3	
	(Glicerol)Glicerol	400	5	25	0.098	23.2	101.7		
	(Glicerol)Glucosa	400	5	25	0.101	24.7	97.0		
	(Glucosa)Glicerol	400	5	25	0.098	18.6	99.6		
Cadenas pesadas y ligeras (Fab)	FB	(Glucosa)Glucosa	400	5	25	0.099	17.7	95.3	Gasser <i>et al.</i> 2006
		Glucosa	550	5	25	0.055	41	160	
Glutación	FB	Complejo	N/D	5	30	0.2	250	98	Fei <i>et al.</i> 2009
Fructose-releasingexo-levanase	FB	Glicerol	500	5	30	N/D	26.6 (U/mL)	59.7	Menendez <i>et al.</i> 2004
Lipasa	FB	Glicerol	40	5	30	N/D	125	N/D	Zhao <i>et al.</i> 2008
Alfa-amilasa	CC	Glucosa	300	6.5	28	N/D	3.3 (g/L)	120	Liu <i>et al.</i> 2012

### **2.3.1. Cultivos en lote alimentado**

Los cultivos en lote alimentado se han empleado en las siguientes condiciones: 1) cuando existe inhibición por sustrato, 2) para alcanzar altas densidades celulares, 3) para evitar la represión por catabolito, 4) cuando se utilizan cepas auxotróficas, 5) para extender el tiempo de cultivo, 6) para reemplazar el líquido perdido debido a la evaporación y 7) para disminuir la viscosidad del medio de fermentación.

En *P. pastoris* se utiliza para incrementar el tiempo de cultivo, alimentando de manera continua con el sustrato iniciando al final del cultivo en lote e incrementar así la producción de proteínas recombinantes. El cultivo en lote alimentado ha sido extensamente usado para procesos de producción recombinante, pues permite la extensión del tiempo de proceso, así como obtener mayor biomasa y concentración de producto por la adición gradual del sustrato (García-Ortega *et al.*, 2019). Las estrategias de alimentación para la fase de lote alimentado usando pulsos de adición, velocidades constantes, rampas y/o pasos, que antes eran protocolos básicos, pueden considerarse obsoletos. El perfil de alimentación exponencial provee una estrategia directa y efectiva para lograr condiciones pseudo-estacionarias (Zhang *et al.*, 2000; García-Ortega *et al.*, 2013; García-Ortega *et al.*, 2016).

Normalmente los cultivos en lote alimentado son diseñados en dos fases. La primera fase, consiste de una fase en batch, donde la cepa productora se cultiva con una concentración inicial de sustrato de 10 a 50 g/L, siendo la más utilizada de 40 g/L. En esta fase, el objetivo principal es la proliferación celular y generalmente tiene una duración 20-30 h hasta que se alcanza cierta densidad celular o se consume el sustrato inicial. Se ha relacionado el agotamiento de la fuente de carbono con un incremento en la señal de la sonda de oxígeno disuelto, por lo que, al detectarse ese incremento, se inicia con la fase de lote alimentado adicionando la fuente de carbono (Çalık *et al.*, 2015).

### **2.3.2. Cultivos continuos**

El cultivo continuo es la estrategia más frecuentemente usada para obtener datos fisiológicos, por el efecto de diferentes variables del proceso en el desempeño de las células. Estudios interesantes se han publicado recientemente, considerando al lote

alimentado menos robusto, más laborioso y consumidor de tiempo (García- Ortega *et al.*, 2019).

Los bioprocesos regulados por promotor *GAP* permiten la expresión de las proteínas recombinantes en cultivos continuos al eliminar la necesidad de una fase de inducción. Se han hecho experimentos utilizando como estrategia el cultivo continuo para la expresión de una quitinasa humana, la cual duró 26 días y se obtuvieron bajos niveles de producción en comparación con los niveles de producción de cultivos en lote alimentado, pero la producción mediante el cultivo continuo estabilizó la secreción de la proteína y no se detectó degradación proteolítica (Goodrick *et al.*, 2001).

### **2.3.3. Efecto de condiciones de cultivo para la 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 o baja producción de la proteína heteróloga de interés. 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 tipos por su origen: químicos, tales como la composición del medio de cultivo, pH del medio de cultivo; físicos, como la temperatura y la aireación del medio de cultivo; e inherentes al microorganismo como la biomasa inicial al momento de la inducción, y capacidad de secreción de la proteína heteróloga.

#### **2.3.3.1.Fuente de carbono**

Se han realizado comparaciones entre glucosa y glicerol como fuentes de carbono (Waterham *et al.*, 1997) donde revelan que el uso de glucosa como fuente de carbono genera mayor producción volumétrica de la proteína heteróloga. Sin embargo, existen estudios donde ocurrió lo contrario, se obtuvieron mayores producciones volumétricas de la proteína heteróloga empleando glicerol como fuente de carbono. Recientemente, surgió un estudio donde se realizó una estrategia en fed-batch donde se reporta el glicerol como fuente de carbono superior en la fase batch, mientras que en la fase de fed-batch el uso de glucosa fue más ventajoso, debido a una menor generación de calor y demanda de oxígeno (García-Ortega *et al.*, 2013). Estos hallazgos revelan que la selección de la fuente de

carbono depende de: 1) el tipo de cultivo (batch o fed-batch), 2) tipo de estrategia para la producción (un rendimiento alto de proteína o la producción de grandes cantidades de biomasa en conjunto con grandes cantidades de proteína recombinante) (Çalik *et al.*, 2015).

### **2.3.3.2.pH**

*P. pastoris* tolera un intervalo 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 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).

### **2.3.3.3.Temperatura**

Cuando se estudia un bioproceso para la producción de proteínas se debe tener en cuenta que la temperatura óptima de crecimiento celular no siempre es equivalente a la temperatura óptima de producción de la proteína heteróloga (Bayraktar, 2009). Además, las proteínas sobreproducidas en el retículo endoplásmico pueden plegarse incorrectamente a alta temperatura 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; Tang *et al.*, 2019).

### **2.3.3.4.Aireación y oxígeno disuelto**

*P. pastoris* es un organismo aeróbico estricto que necesita altas cantidades de oxígeno cuando se crece en metanol y algo menores en cultivos con glicerol o glucosa. 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) 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).

#### **2.3.3.5. Velocidad específica de crecimiento y cinética de producción**

La cinética de producción se relaciona con la formación de producto específica ( $q_p$ ) y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) es usualmente considerado como un factor crucial para la eficiencia del bioproceso, sin importar el criterio de selección para la optimización del bioproceso. (Barrigón *et al.* 2015). La cinética de formación de producto refleja el equilibrio entre varios pasos hasta que el producto es secretado y está sujeto a numerosos factores fisiológicos (García-Ortega *et al.*, 2019). Normalmente, el perfil de alimentación se optimiza como una variable de decisión, mientras que en otras aplicaciones la meta de optimización es encontrar el mejor valor para  $\mu$  o  $q_s$  en los cuales la productividad volumétrica o  $Y_{p/x}$  se maximiza.

La mayoría de los procesos industriales para la producción de proteínas recombinantes está asociado al crecimiento, de hecho, la  $q_p$  optima usualmente se obtiene cuando se emplean altas  $\mu$  (Looser *et al.*, 2015). Mayores cantidades de producto se generan cuando se realiza el bioproceso a menores tasas de crecimiento, lo que lleva a largos tiempos de fermentación antes de que el proceso se detenga debido a las limitaciones del sistema.

#### **2.3.4. Efectos multifactoriales de las condiciones de cultivo**

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

Por lo tanto, 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).

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 empírico 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 y 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 asigna 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, posteriormente 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 como pruebas de hipótesis sobre las variables que se encuentran dentro del simplex (Scott, 2007).

Recientemente, se realizó una optimización de este tipo de 5 factores ambientales para incrementar la producción de una fitasa termoestable en *P. pastoris* empleando el promotor *AOXI*, donde se consiguió una producción extracelular de 6.4 g/L de cultivo (Castillo-Galván 2014).

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

En el año 2009, se obtuvo la primera secuenciación de genoma completo de una cepa de *P. pastoris* (GS115), estudio que proporcionó 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.

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 estos ensayos están disponibles desde 2009 en el GenBank NCBI (De Shutter *et al.*, 2009).

Se han realizado estudios mediante análisis de transcripción de genes clave en la ruta de secreción, que bajo dos condiciones de cultivo comparadas (la de mayor producción (CM) y la de peor (CP)), donde se encontró que el proceso de secreción es más eficiente en CM, donde se presentó una mayor expresión del gen *KEX2* y de los genes de proteasas vacuolares (*PEP4*, *PRB1*, y *PRC1*), además de *KAR2* (chaperona) (Viader- Salvadó *et al.*, 2010; Castillo-Galván, 2014).

También se han realizado análisis transcripcionales de la vía de secreción y del metabolismo del metanol en los cultivos CM y CP, donde se concluyó que las condiciones empleadas en CM promovieron la expresión de genes relacionados con la secreción, plegamiento y traducción de proteínas, además promovieron la expresión de la ruta de metabolismo de metanol dirigiéndola hacia la asimilación (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2015).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La producción de proteínas recombinantes se ha vuelto una actividad esencial en la validación funcional, biología estructural y la producción de polipéptidos de interés farmacéutico e industrial.

Hasta el momento no se tienen reportes de optimización de condiciones de cultivo empleando un diseño de experimentos multifactoriales con un promotor constitutivo (*GAP*).

Este estudio permitirá mejorar el sistema de expresión de *P. pastoris* al buscar condiciones de cultivo que permitan obtener rendimientos similares o mejores empleando un promotor constitutivo (*GAP*) sin metanol a los cultivos que emplean el sistema de *AOXI*.

Se incrementará el conocimiento sobre mecanismos y genes de rutas metabólicas que están relacionadas con la sobreproducción en sistemas con promotores constitutivos (*GAP*) y podrá servir de referencia para la construcción de cepas a partir de un casete de expresión sintético. Podrán localizarse genes que se activen con determinadas condiciones de cultivo y que potencien la expresión del gen heterólogo, así como que permitan un mejor procesamiento post-traducciona



#### **4. HIPÓTESIS**

Las condiciones de cultivo influyen en la respuesta fisiológica durante la sobreproducción de proteínas heterólogas reguladas por un promotor constitutivo en *P. pastoris*.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la respuesta fisiológica de cepas de *Pichia pastoris* a condiciones de sobreproducción de proteínas heterólogas reguladas por un promotor constitutivo.

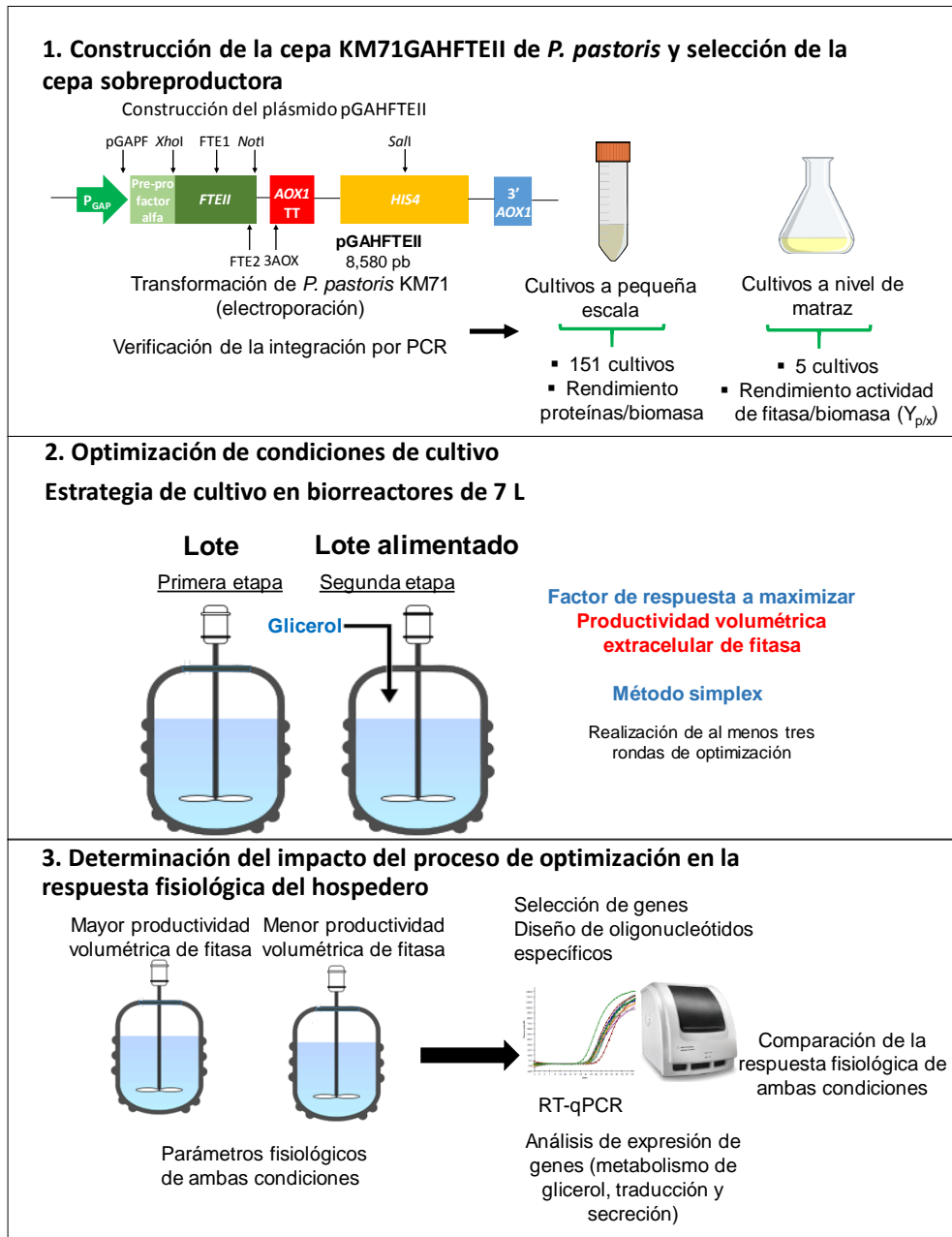
### Objetivos específicos

- 1.- Construir cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del gen heterólogo *FTEII* regulado por el promotor *GAP* y seleccionar una cepa sobreproductora de la proteína recombinante.
- 2.- Optimizar cuatro factores ambientales que constituyen las condiciones de cultivo para incrementar la productividad extracelular de la proteína recombinante FTEII a nivel de biorreactor.
- 3.- Determinar y comparar la respuesta fisiológica de la cepa seleccionada de *P. pastoris* a condiciones de alta y baja producción de la proteína recombinante FTEII.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Estrategia general

Para el cumplimiento de los objetivos planteados en este trabajo, se implementó la siguiente estrategia (Figura 2). La primera etapa consistió en la construcción cepas de *P. pastoris* capaces de producir de forma constitutiva la fitasa con estructura de hélice denominada FTEII (Viader-Salvadó et al., 2010) de forma extracelular. Posteriormente, se seleccionó una cepa sobreproductora de la fitasa FTEII mediante cultivos en pequeña escala empleando el rendimiento de proteínas extracelulares/biomasa como criterio de selección. Con la cepa seleccionada, se optimizaron cuatro factores que constituyen las condiciones de cultivo (concentración inicial de glicerol, y el pH, temperatura y velocidad específica de crecimiento en la etapa de lote alimentado con glicerol) para incrementar la productividad volumétrica extracelular de la fitasa FTEII en cultivos en biorreactor de 7 litros usando el método Simplex. Se determinaron parámetros fisiológicos (rendimiento celular proveniente del glicerol,  $Y_{x/s}$ ; rendimiento de producción extracelular de fitasa/biomasa,  $Y_{p/x}$ ; rendimiento de producción extracelular de fitasa proveniente de glicerol,  $Y_{p/s}$ ) y los niveles de expresión de los genes relacionados con el metabolismo de glicerol, traducción de proteínas y secreción y *FTEII* (gen heterólogo). Finalmente, se correlacionaron y compararon los tres rendimientos ( $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/s}$ ,  $Y_{p/x}$ ) y los niveles de expresión de los genes mencionados con la productividad volumétrica de FTEII y con los cuatro factores que constituyen las condiciones de cultivo (Figura 2).



**Figura 2.** Estrategia general para la determinación de la respuesta fisiológica de cepas de *P. pastoris* en condiciones optimizadas de cultivo para la sobreproducción de proteínas recombinantes.

## **6.2. Construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del gen heterólogo *FTEII* regulado por el promotor *GAP***

### **6.2.1. Obtención y caracterización de DNA plasmídico de *Escherichia. coli* JM109 pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX**

Para obtener los plásmidos pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX construido previamente, se activaron conservas en glicerol de las cepas de *E. coli* JM109 que contenían los plásmidos. Se inocularon 25 mL de medio LB (Bactotripton 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%) con ampicilina (100 µg/mL) contenidos en un matraz de 250 mL con 100 µL de la conserva. Se incubó el matraz en una incubadora de piso con agitación a 250 rpm a 37°C por 18 horas. Se colocó el cultivo en un tubo de centrifuga de 50 mL, se hizo un paquete celular mediante centrifugaciones a 14000 rpm por 10 min, y se extrajo el DNA plasmídico empleando el Kit PureYield Plasmid Midiprep system de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido fue calentado a 65°C por 20 min, se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y se cuantificó la concentración de DNA empleando el nanofotómetro P-300 de Implen.

Posteriormente, los plásmidos pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX se caracterizaron por digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI* y por PCR con oligonucleótidos específicos para fitasa (FTE1 y FTE2) en el caso de pGEMFTEIIAOX y con los oligonucleótidos pGAPF y 3AOX para el plásmido pGAHFTEIV.

Para caracterizar los plásmidos pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX por digestión enzimática, se realizaron mezclas de reacción para la muestra y un control negativo sin enzima, empleando las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI*, las cuales generan dos bandas de 7499 y 1081 pb para pGAHFTEIV; 3470 y 1081 pb para pGEMFTEIIAOX. Se realizó una mezcla de reacción agregando 16 µL de agua estéril libre de nucleasas, 4 µL de solución amortiguadora CutSmart de NEB (10X), 1.0 µL de la enzima *XhoI* (20 U/µL), 1.0 µL de la enzima *NotI*-HF (100 U/µL) y 16 µL de DNA plasmídico. Se repartió en dos tubos donde cada tubo contenía 18 µL del coctel y se añadieron las enzimas correspondientes a uno de ellos (Tabla 4). Para el control negativo de la reacción se emplearon 2 µL de agua estéril libre de nucleasas. Se incubaron las reacciones a 37°C por

18 horas. Después del periodo de incubación, se analizaron 3  $\mu\text{L}$  cada reacción en un gel de agarosa al 0.8%

**Tabla 4.** Mezcla de reacción de la digestión enzimática con *XhoI* y *NotI* de los plásmidos pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX.

Reactivo	Volumen (1X) ( $\mu\text{L}$ )	Volumen 2X ( $\mu\text{L}$ )
Agua estéril libre de nucleasas	8.0	16
Buffer CutSmart (10X)	2.0	4.0
Enzima <i>XhoI</i> (20 U/ $\mu\text{L}$ )	1.0	-
Enzima <i>NotI</i> -HF (100 U/ $\mu\text{L}$ )	1.0	-
DNA (pGAHFTEIV o pGEMFTEIIAOX) 180 ng/ $\mu\text{L}$	8.0	16
Volumen total	20.0	36.0 $\mu\text{L}$

Para la caracterización por PCR del plásmido pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV se realizó una reacción de PCR con los oligonucleótidos FTE1 y FTE2, los cuales amplifican un fragmento de 538 pb. También se realizó con los oligonucleótidos pGAPF y 3AOX que amplifican un fragmento de 1475 pb. Para montar la reacción se realizó un coctel con los siguientes reactivos: 13.3  $\mu\text{L}$  de agua estéril libre de nucleasas, 5  $\mu\text{L}$  de Green Buffer (5X), 2.5  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido (5  $\mu\text{M}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTP's (10 mM cada uno), 0.2  $\mu\text{L}$  de la enzima GoTaq® Polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  del DNA de la muestra. De la misma manera se realizaron dos mezclas adicionales, en una de ellas se agregó agua libre de nucleasas en lugar de DNA como control negativo y en la otra se agregó 1  $\mu\text{L}$  DNA genómico de *P. pastoris* KM71FTEII como control positivo para pGEMFTEIIAOX y DNA genómico de *P. pastoris* KM71GAPFTEII como control positivo para la PCR de pGAHFTEIV.

En la Tabla 5, se muestran los volúmenes empleados en la reacción, el volumen total fue dividido en 3 alícuotas de 24  $\mu\text{L}$ , una para cada reacción (control positivo, control negativo y la muestra) y en la Tabla 6 se muestran las condiciones del ensayo.

**Tabla 5.** Mezcla de reacción para la caracterización por PCR de pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV

Reactivo	Concentración	Volumen (1X) ( $\mu\text{L}$ )	Volumen (3X) ( $\mu\text{L}$ )
Green Buffer	5X	5.0	15.0
dNTP's	10 mM	0.5	1.5
Oligonucleótido 5'	5 mM	2.5	7.5
Oligonucleótido 3'	5 mM	2.5	7.5
<i>GoTaq</i> DNA polimerasa	5 U/ $\mu\text{L}$	0.2	0.6
DNA molde	100 ng/ $\mu\text{L}$	1.0	-
Agua estéril libre de nucleasas	-	13.3	39.9
Volumen final	-	25.0	72.0

**Tabla 6.** Condiciones del ensayo de PCR

Ciclos	Duración	Temperatura
1	2 minutos	94°C
	1 minuto	94°C
30	1 minuto	50°C
	2 minutos	72°C
1	10 minutos	72°C

Finalmente, de cada tubo de reacción se tomaron 5  $\mu\text{L}$  para ser analizados en un gel de agarosa al 0.8%.

### 6.2.2. Digestión preparativa de los plásmidos pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX con las enzimas *XhoI* y *NotI*

Se realizó la digestión preparativa los plásmidos pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX para obtener los fragmentos *FTEII* y pGAH con las enzimas *XhoI* y *NotI*, para posteriormente construir el plásmido pGAHFTEII y transformar células competentes de *P. pastoris* KM71. Para la digestión, se emplearon 3 y 8  $\mu\text{g}$  totales de DNA respectivamente. Se hicieron las reacciones con los volúmenes que se encuentran en la Tabla 7. Posteriormente, los tubos fueron incubados a 37°C por 3 horas. Finalmente, 2  $\mu\text{L}$  del producto resultante de la digestión fue analizado en un gel de agarosa al 0.8%. El resto de

la mezcla de reacción se sometió a una electroforesis preparativa para poder obtener los fragmentos pGAH y *FTEII*

**Tabla 7.** Mezcla de reacción de la digestión preparativa de pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX con *XhoI* y *NotI*

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (1X) (<math>\mu</math>L)</b>
Agua estéril libre de nucleasas	7.0
Buffer CutSmart (10X)	4.0
Enzima <i>XhoI</i> (20 U/ $\mu$ L)	2.0
Enzima <i>NotI</i> -HF (100 U/ $\mu$ L)	2.0
DNA (pGAHFTEIV o pGEMFTEIIAOX) 180 ng/ $\mu$ L	25.0
Volumen total	40.0

La purificación preparativa de los fragmentos a clonar se realizó como sigue: al depósito de la cámara de electroforesis se transfirió SDS 0.1% y se dejó reposar durante una hora, cuidadosamente éste fue retirado de la cámara, y la cámara se enjuagó tres a cinco veces con agua estéril, se decantó el agua y se vertió TBE 1X libre de nucleasas (estéril) posteriormente se realizó una electroforesis en agarosa 0.8 % en TBE 1X libre de nucleasas (estéril). Una vez finalizada la electroforesis, el gel se colocó sobre una película de parafilm fino y este a su vez sobre el transiluminador, con la intensidad de luz UV más baja, y con la ayuda de una navaja estéril, se cortaron los fragmentos de interés. Cada uno de los fragmentos obtenidos se colocaron en un tubo de microcentrífuga nuevo estéril previamente pesado y por diferencia de pesos se obtuvo el peso total de la agarosa contenida en el tubo. Los fragmentos del gel de agarosa recuperados fueron purificados con el Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las concentraciones de DNA de los fragmentos purificados se estimaron mediante el análisis con el marcador 1kb DNA Ladder de Promega), de acuerdo al tamaño del fragmento en pares de bases y a la masa correspondiente del fragmento (ng). El DNA purificado del vector (pGAH) y del inserto (*FTEII*) fueron guardados a 4°C hasta su ligación.



### 6.2.3. Construcción del plásmido pGAHFTEII y transformación en *E. coli* TOP10

La mezcla de reacción se realizó (Tabla 8) en tubos de 0.2 mL, conteniendo 70.26 ng de *FTEII* y 100 ng de pGAH, así como los componentes necesarios para su ligación (agua libre de nucleasas y buffer) excepto la enzima T4 DNA ligasa. Se preparó un cóctel de 20  $\mu$ L, el control negativo se preparó con 10  $\mu$ L del coctel y no se agregó enzima. El resto del cóctel se transfirió a otro tubo y se agregó 1  $\mu$ L de DNA T4 ligasa. La mezcla de reacción (10  $\mu$ L) se incubó a temperatura ambiente por 3 horas. Para el análisis por electroforesis de ligación se tomaron 2  $\mu$ L de la mezcla de reacción y el resto se empleó para la transformación de *E. coli* TOP10 (Invitrogen) calcio competentes. En la Tabla 8 se muestran los componentes de la reacción de ligación del fragmento *FTEII* con el vector pGAH.

**Tabla 8.** Componentes de la reacción de ligación del fragmento *FTEII* con el vector pGAH.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
Buffer de ligación 10X	2.0
Vector pGAH (100 ng)	10.0
Fragmento <i>FTEII</i> (70.26 ng)	5.5
Agua ultrapura	1.0
DNA T4 ligasa	1.0
Total	20

La transformación de células *Escherichia coli* TOP10 con el vector pGAHFTEII construido se realizó con una mezcla de 50  $\mu$ L de células calcio competentes y 4  $\mu$ L de la mezcla de reacción de ligación con el vector pGAHFTEII.

Con el producto de la reacción de ligación, se llevó a cabo la transformación de células *Escherichia coli* TOP10 químicamente competentes, para lo que se realizó el siguiente procedimiento: a 50  $\mu$ L de células se le agregaron 4.0  $\mu$ L de la mezcla de reacción de ligación. La suspensión celular se mezcló suavemente, esta mezcla se incubó en hielo por 30 minutos, luego se sometió a un choque térmico por 42°C por 45 segundos y se transfirió inmediatamente a hielo por 2 minutos. A continuación, a esta suspensión celular se le agregaron 250  $\mu$ L de medio SOC (Tripton 2%, extracto de levadura 0.5%,

NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM) y se incubó durante una hora a 37°C a 250 rpm. Por último, 100 µL de la suspensión celular se sembraron en placas de LB con ampicilina [(Tryptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, ampicilina (100 µg/mL) y agar (15 g/L)]. Para la selección de cepas recombinantes de *Escherichia coli* portadoras del plásmido pGAHFTEII, las placas se incubaron en una incubadora estática a 37°C de 16-24 horas.

Las cepas transformantes que crecieron en placas de LB con ampicilina se inocularon en medio LB líquido con ampicilina (Tryptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, ampicilina 100 µg/mL), se incubaron a 37°C, 250 rpm durante 14-18 horas para obtener el DNA plasmídico necesario para su caracterización por el método de lisis alcalina, la preparación obtenida se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X y se almacenó a 4°C hasta su posterior uso.

Para caracterizar los plásmidos pGAHFTEII obtenidos previamente, por digestión enzimática, se realizaron mezclas de reacción para cinco muestras empleando las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI*, las cuales generan dos bandas de 7499 y 1081 pb para pGAHFTEII. Se realizó una mezcla de reacción agregando 52 µL de agua estéril libre de nucleasas, 10 µL de solución amortiguadora CutSmart de NEB (10X), 4.0 µL de la enzima *XhoI* (20 U/µL) y 4.0 µL de la enzima *NotI* (100 U/µL). Se repartió en cinco tubos donde cada tubo contenía 14 µL del coctel (Tabla 9). Se incubaron las reacciones a 37°C por 18 horas. Después del periodo de incubación, se analizaron 3 µL cada reacción en un gel de agarosa al 0.8%.

**Tabla 9.** Mezcla de reacción de la digestión enzimática con *XhoI* y *NotI* de los plásmidos pGAHFTEII

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (1X) (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volumen 5X (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Agua estéril libre de nucleasas	10.0	50.0
Buffer CutSmart (10X)	2.0	10.0
Enzima <i>XhoI</i> (20 U/ $\mu\text{L}$ )	1.0	4.0
Enzima <i>NotI</i> -HF (100 U/ $\mu\text{L}$ )	1.0	4.0
DNA (pGAHFTEII)	6.0	-
Volumen total	20.0	70.0 $\mu\text{L}$

Para la caracterización por PCR del plásmido pGAHFTEII se realizaron dos reacciones de PCR con los oligonucleótidos FTE1 y FTE2. También se realizó con los oligonucleótidos pGAPF y 3AOX. Para montar la reacción se realizó un coctel con los siguientes reactivos: 13.3  $\mu\text{L}$  de agua estéril libre de nucleasas, 5  $\mu\text{L}$  de Green Buffer (5X), 2.5  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido (5  $\mu\text{M}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTP's (10 mM cada uno), 0.2  $\mu\text{L}$  de la enzima GoTaq Polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  del DNA de la muestra. De la misma manera se realizaron dos mezclas adicionales, en una de ellas se agregó agua libre de nucleasas en lugar de DNA como control negativo y en la otra se agregó 1  $\mu\text{L}$  DNA plasmídico pGEMFTEIIAOX como control positivo para la PCR con los oligonucleótidos FTE1 y FTE2 y DNA plasmídico pGAHFTEIV como control positivo para la PCR con los oligonucleótidos pGAPF y 3AOX.

En la Tabla 10 se muestran los volúmenes empleados en la reacción, el volumen total fue dividido en 7 alícuotas de 24  $\mu\text{L}$ , una para cada reacción (control positivo, control negativo y las muestras) y en la Tabla 11 se muestran las condiciones del ensayo.

**Tabla 10.** Mezcla de reacción para la caracterización por PCR de pGAHFTEII

Reactivo	Concentración	Volumen (1X) ( $\mu\text{L}$ )	Volumen (7X) ( $\mu\text{L}$ )
Green Buffer	5X	5.0	35.0
dNTP's	10 mM	0.5	3.5
Oligonucleótido 5'	5 mM	2.5	17.5
Oligonucleótido 3'	5 mM	2.5	17.5
<i>GoTaq</i> DNA polimerasa	5 U/ $\mu\text{L}$	0.2	-
DNA molde	100 ng/ $\mu\text{L}$	1.0	-
Agua estéril libre de nucleasas	-	13.3	93.1
Volumen final	-	25.0	168.0

**Tabla 11.** Condiciones del ensayo de PCR

Ciclos	Duración	Temperatura
1	2 minutos	94°C
	1 minuto	94°C
30	1 minuto	50°C
	2 minutos	72°C
1	10 minutos	72°C

Finalmente, de cada tubo de reacción se tomaron 5  $\mu\text{L}$  para ser analizados en un gel de agarosa al 0.8%.

#### **6.2.4. Preparación a mediana escala del plásmido pGAHFTEII y transformación de *P. pastoris* KM71**

Se realizó la digestión preparativa para linearizar el vector pGAHFTEII con la enzima *Sall*, para posteriormente transformar células competentes de *P. pastoris* KM71. Para la digestión, se emplearon 12  $\mu\text{g}$  totales de DNA obtenidos de la extracción de mediana escala realizada en el punto anterior. Se hicieron las reacciones con los volúmenes que se encuentran en la Tabla 12. Posteriormente, los tubos fueron incubados a 37°C por 18

horas. Finalmente, el producto resultante de la digestión fue analizado en un gel de agarosa al 0.8% como se describió previamente.

**Tabla 12.** Componentes y volúmenes de la digestión preparativa de pGAHFTEII con *SalI*.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (1X) (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volumen (6X) (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Agua estéril libre de nucleasas	11.8	28.8
Buffer D (10X)	2.0	12.0
BSA (100X)	0.2	1.2
Enzima <i>SalI</i> (5 U/ $\mu\text{L}$ )	1.0	6.0
DNA (pGAHFTEII 178ng/ $\mu\text{L}$ )	12.0	72.0
Volumen total	20.0	120.0

Para remover las enzimas y sales contaminantes, todas las muestras de DNA fueron recolectadas y limpiadas con los Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices. La muestra fue colocada en un cartucho adaptado a un tubo de 2.0 mL y posteriormente se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de agua estéril libre de nucleasas. Se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y al finalizar se descartó el sobrenadante. Se hicieron 3 lavados de la misma manera y un último lavado se hizo agregando 400  $\mu\text{L}$  de agua estéril libre de nucleasas que fue centrifugado a 14000 rpm durante 20 min, para un total de 4 lavados. Finalmente, se recuperó la muestra colocando el cartucho de manera invertida en un tubo nuevo de 2.0 mL, se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min y se calentó a 65°C por 20 min.

Para concentrar la muestra de DNA, se utilizó el equipo Centrivap (Labconco). Se colocó la muestra en un tubo de 0.2 mL, en otro tubo se colocó un contrapeso de agua con el mismo volumen que la muestra y se realizó una marca en el tubo indicando el volumen final esperado. Se utilizó el programa 3 del equipo que corresponde a una temperatura de 42°C a 1000 rpm y se mantuvo activo hasta que el volumen llegara a la marca.

Para la preparación de células electrocompetentes para la transformación por electroporación, se inocularon 10 mL de medio YPD en un tubo de 50 mL con 100  $\mu\text{L}$  de la cepa KM71 de *P. pastoris* y se incubó a 250 rpm a 30°C hasta que el cultivo alcanzó una  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  de 6. A partir del cultivo anterior, se inocularon 100 mL de medio YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Dextrosa 2%) ( en un matraz de 500 mL con 1.17

mL del cultivo, iniciando con una  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0.1, se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm hasta que la  $DO_{600}$  llegó al valor de 1.0. Después, se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 2000 g y  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 min en dos tubos de centrifuga de 50 mL, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en medio YPD-HEPES. La mezcla de YPD-HEPES-células se traspasó a un matraz estéril de 500 mL y se añadieron 0.5 mL de DTT 1 M. Se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  por 15 min en una incubadora con agitación a 250 rpm. Posteriormente, la mezcla de células y medio YPD-HEPES-DTT se aforó a 100 mL con agua destilada fría y estéril, se colocó en dos tubos de centrifuga de 50 mL y se centrifugó a 2000 g por 10 min y  $4^{\circ}\text{C}$ , hasta obtener los paquetes celulares. Se descartó el sobrenadante, los paquetes celulares se resuspendieron en 50 mL de agua fría y estéril, y se centrifugó a 5000 g por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta obtener los paquetes celulares. A continuación, se descartó el sobrenadante resultante, se resuspendió en 4 mL de sorbitol 1 M frío y estéril en un sólo tubo de centrifuga de 50 mL, y se centrifugó a 5000 g por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  con su respectivo contrapeso hasta la obtención del paquete celular. Finalmente se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de sorbitol frío y estéril, quedando un volumen final de 0.2-0.3 mL (incluyendo las células) que se distribuyó en alícuotas de 40  $\mu\text{L}$  en tubos de microcentrífuga de 2.0 mL, los cuales se envolvieron en múltiples capas de papel secante, se sellaron en una caja de plástico resistente y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La transformación de las células electrocompetentes preparadas previamente se llevó a cabo utilizando el sistema de electroporación Gene Pulser® II. Electroporation System (Bio-Rad). Primero, se conectó el tren de carga de la celda en el “Controller pulser” y a su vez, el “Controller pulser” fue conectado en el Gene Pulser II, y finalmente fue conectado a la fuente de electricidad. Se encendió el Gene Pulser II y se ajustaron los parámetros de resistencia (400  $\Omega$ ), capacitancia (25  $\mu\text{F}$ ), voltaje (1.5 kV). Se tomó un tubo con células de *P. pastoris* KM71 preparadas y se mezcló con el DNA linearizado y desalado, se vertió en una cubeta de 2 mm de electroporación previamente enfriada en hielo durante 2 minutos. La celda se introdujo en el tren del electroporador para después ser empujado hacia los electrodos del equipo. Una vez colocado en su posición, se realizó la descarga eléctrica a las células, siendo la cubeta colocada inmediatamente después en hielo. Se agregó 1 mL de sorbitol 1 M frío y estéril, el cual fue homogenizado por

inversión de 5 a 10 veces. Se hizo una siembra por extensión en placa de las células electroporadas en placas con medio YPD agar y RDB His<sup>r</sup>. Se incubaron a 30°C por 48-120 horas hasta la aparición de colonias transformadas. Se seleccionaron inicialmente 10 colonias al azar, se inocularon en medio líquido YPD y se incubaron a 30°C en agitación a 250 rpm por 24 horas.

A partir de 4 mL del cultivo, se hicieron los paquetes celulares por medio de dos centrifugaciones sucesivas a 14000 rpm, descartando el sobrenadante entre cada una. A los paquetes celulares obtenidos, se les añadieron 200 µL de solución amortiguadora de lisis TSNT y se agitaron por inversión 20 veces. Se agregaron 500 µL de Fenol saturado con Tris-HCl y se agitaron nuevamente por inversión 20 veces. Posteriormente, se añadieron 100 µL de Sevag (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1) a cada tubo y se mezclaron en un vortex por 5 min. Después, se adicionaron 200 µL de TE 1X, los tubos se agitaron por inversión 5 veces y se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Se transfirió la parte acuosa de los sobrenadantes obtenidos a tubos nuevos de 2.0 mL, se añadió 1 mL de etanol frío al 100% a cada uno y se mezclaron por inversión 20 veces, observándose la precipitación del DNA en cada tubo. Los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 15 min a 0°C y el sobrenadante resultante de cada tubo fue descartado. Las pastillas que quedaron en los tubos, se lavaron con 1 mL de etanol 70% y se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min a 0°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante de los tubos y se colocaron sobre papel absorbente, a los cuales, una vez que se eliminó el exceso de etanol, se resuspendieron en 100 µL de TE 1X, las muestras se calentaron a 65°C por 20 min, se analizaron en geles de agarosa al 0.8% y se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior.

#### **6.2.5. Caracterización genotípica de las cepas recombinantes de *P. pastoris* KM71GAHFTEII**

Se realizaron ensayos de PCR utilizando los oligonucleótidos específicos pGAPF: y FTE2 Tal como se describió previamente. En la Tabla 13 se muestran los volúmenes empleados para la mezcla de reacción. Se empleó DNA plasmídico utilizado para la transformación como control positivo de PCR y agua estéril libre de nucleasas como control negativo. Se utilizaron las mismas condiciones del programa del termociclador de la Tabla 11.

Finalmente, de cada tubo de reacción se tomaron 3  $\mu\text{L}$  para ser analizados en un gel de agarosa al 0.8%.

**Tabla 13.** Volúmenes de la mezcla de reacción para la verificación de la integración del casete de expresión de las clonas transformantes.

Reactivo	Concentración	Volumen (1X) ( $\mu\text{L}$ )	Volumen (12X) ( $\mu\text{L}$ )
Green Buffer	5X	5.0	60.0
dNTP's	10 mM	0.5	6.0
Oligonucleótido 5'pGAPF	5 mM	2.5	30.0
Oligonucleótido FTE2	5 mM	2.5	30.0
GoTaq DNA polimerasa	5 U/ $\mu\text{L}$	0.2	2.4
DNA	100 ng/ $\mu\text{L}$	1.0	-
Agua estéril libre de nucleasas	-	13.3	159.6
Volumen final	-	20.0	288.0

### 6.3. Selección de cepas de *P. pastoris* sobreproductoras de la proteína recombinante FTEII regulada por el promotor GAP

#### 6.3.1. Cultivos en tubo agitado

Para seleccionar la cepa sobreproductora de la fitasa FTEII regulada por el promotor *GAP* se realizaron cultivos en tubos agitados de 50 mL en dos etapas, la primera etapa consiste en un cultivo en lote de glicerol durante 20 h y la segunda etapa consiste en una etapa de lote alimentado con glicerol (una sola adición a las 20 h) para un tiempo final de cultivo de 30 h. Para ello, se inocularon 10 mL de medio YPD contenidos en tubos de 50 mL con 100  $\mu\text{L}$  de cada clona KM71GAHFTEII de *P. pastoris* y se incubaron a 30°C en agitación de 250 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica final ( $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ ) entre 8-10. Después se inocularon 8 mL de medio BMG-CaCl<sub>2</sub> (Buffer de fosfatos 100 mM, glicerol 1%, YNB 1.34%, biotina 1X, CaCl<sub>2</sub> 0.1%) contenidos en tubos de centrifuga de 50 mL con 2 mL del cultivo celular reactivado, para un volumen final de 10 mL y una  $\text{DO}_{600 \text{ nm}} \sim 1.4$ , se incubó a 30°C durante 20 h a 250 rpm. Después de las 20 h de incubación se midió  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  y se añadió 1 mL de glicerol al 10% p/v y de incubó por 10 h, para un tiempo total de 30 h de cultivo. Al final del cultivo, se midió la  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  y se centrifugó a 8000 rpm a 4° para recuperar el medio de cultivo libre de células. Se almacenó a -20°C el paquete celular y medio de cultivo libre de células para realizar determinaciones posteriores.



### 6.3.2. Determinación de la producción de proteínas extracelulares y rendimiento proteínas extracelulares/biomasa

Para la determinación de la concentración de proteínas totales se empleó el método de Bradford, el cual se describe a continuación. Se utilizó una solución de ASB 50 µg/mL como estándar para determinación de la concentración de proteínas, de la cual se realizaron por triplicado una serie de diluciones a determinada concentración para los estándares en tubos de 2 mL. En la Tabla 14, se muestran la concentración de los estándares y los volúmenes empleados en las diluciones. Una vez preparados los estándares de ASB, se agregaron 800 µL de azul de Coomassie, se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se hicieron lecturas en el espectrofotómetro a 595 nm. Los valores fueron registrados en una plantilla de Microsoft Excel y a partir de los datos obtenidos, se realizó una recta de calibración, la cual se utilizó para la interpolación de los valores obtenidos de las muestras.

**Tabla 14.** Concentración de los estándares de ASB para la recta de calibración.

<b>Estándar</b>	<b>Concentración (µg/mL)</b>	<b>ASB (50 µg/mL) (µL)</b>	<b>Agua destilada (µL)</b>	<b>Azul de Coomassie (µL)</b>
1	0.0	0.0	200.0	800.0
2	5.0	20.0	180.0	800.0
3	7.5	30.0	170.0	800.0
4	15.0	60.0	140.0	800.0
5	22.5	90.0	110.0	800.0
6	30.0	120.0	80.0	800.0
7	45.0	180.0	20.0	800.0

Para la preparación de las muestras a analizar, se realizaron diluciones 1:2 de los sobrenadantes libres de células, se agregaron 800 µL de azul de Coomassie en un tubo de 2.0 mL por triplicado y se midió la absorbancia a 595 nm. Para calcular la concentración de proteínas en las muestras, se realizó una gráfica de absorbancia a 595 nm contra la concentración en µg/mL de los estándares empleados, donde se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos de las muestras y se multiplicaron por el factor de dilución para obtener la concentración real de la muestra en µg/mL.

Para la determinación de la densidad celular en g/L de células secas, se multiplicó la  $DO_{600nm}$  obtenida de cada cultivo a las 30 h de cultivo por 0.23.

Para la determinación del rendimiento proteínas extracelulares/biomasa, se multiplico la densidad celular obtenida del cultivo en g/L de células secas por la concentración de proteínas extracelulares en  $\mu\text{g/mL}$ . El rendimiento proteínas/biomasa fue medido en mg de proteína extracelular por gramo de biomasa (mg/g). Se seleccionaron las cepas con mayor rendimiento para los siguientes experimentos.

### **6.3.3. Cultivos en matraz**

Se realizaron cultivos en BMG- $\text{CaCl}_2$  con las cinco cepas con mayor rendimiento proteínas extracelulares/biomasa a nivel de matraz para comprobar los resultados obtenidos en los cultivos en tubo agitado.

Se inocularon 10 mL de medio YPD contenidos en tubos de 50 mL con 100  $\mu\text{L}$  de cada clona KM71GAHFTEII de *P. pastoris* y se incubaron a 30°C en agitación de 250 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica final ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) entre 8-10. Después se inocularon 40 mL de medio BMG- $\text{CaCl}_2$  contenidos en matraces de 500 mL con 10 mL del cultivo celular reactivado, para un volumen final de 50 mL y una  $DO_{600\text{ nm}} \sim 1.4$ , se incubó a 30°C durante 20 h a 250 rpm. Después de las 20 h de incubación se midió  $DO_{600\text{ nm}}$  y se añadieron 5 mL de glicerol al 10% p/v y de incubó por 10 h, para un tiempo total de 30 h de cultivo. Al final del cultivo, se midió la  $DO_{600\text{ nm}}$  y se centrifugó a 8000 rpm a 4° para recuperar el medio de cultivo libre de células. Se almacenó a -20°C el paquete celular y medio de cultivo libre de células para realizar determinaciones posteriores.

### **6.3.4. Determinación de la producción de proteínas extracelulares, producción de fitasa y rendimiento actividad de fitasa/biomasa ( $Y_{p/x}$ )**

Para determinar la actividad de fitasa de los sobrenadantes libres de células, se desalaron las muestras utilizando cromatografía de exclusión molecular. Se lavó previamente una columna PD-10 Sephadex G-25 con 25 mL de solución amortiguadora (Tris-HCl 100 mM, NaCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM y glicerol 2%) y se eluyó por gravedad hasta descartar la totalidad de la solución. Se añadieron a la columna 600  $\mu\text{L}$  de la muestra y 1900  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora, 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  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora y se eluyó por gravedad colectando toda la fase móvil que eluyó de la columna en un tubo de 15 mL. Después de la elución, la muestra desalada quedó diluida 5.83 veces respecto a su concentración inicial.

La determinación de la actividad de fitasa se llevó a cabo mediante el método descrito por Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010. Ese método cuantifica la liberación del fosfato inorgánico por acción de la fitasa sobre el fitato de sodio por unidad de tiempo. Para estos ensayos se empleó como sustrato fitato de sodio (sal dodecasódica del ácido hexafosfórico de inositol) (Sigma Aldrich Corporation, PM: 770.04). La actividad de fitasa fue medida en buffer de actividad de 100 mM de Tris-HCl pH 7.5 y 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Esta solución fue precalentada a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min antes de realizar la reacción enzimática.

La elaboración de la recta de calibración se realizó por triplicado de acuerdo con Tabla 15 utilizando una solución stock de fosfato de potasio monobásico 1.64 mM preparado con buffer de actividad de 100 mM de Tris-HCl pH 7.5 y 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

**Tabla 15.** Volúmenes para la preparación de los estándares para la curva de calibración.

<b>Estándar de fosfato (mM)</b>	<b>Volumen requerido del estándar (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volumen de buffer de actividad (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
0.0	0	100
0.57	35	65
1.02	62	38
1.64	100	0

Los estándares se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos en un Thermomixer R (Eppendorf). Se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de TCA al 15%, posteriormente se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de colorante recién preparado (ácido ascórbico 10%, molibdato de amonio 2.5%, ácido sulfúrico 6 N). Se incubaron los tubos de los estándares a  $37^\circ\text{C}$  por 45 min, y se midió la absorbancia a 820 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU650, calibrado a cero con una celda de poliestireno y buffer de actividad. Los valores fueron registrados en una plantilla de Microsoft Excel y a partir de los datos obtenidos, se realizó una recta de calibración, la cual se utilizó para la interpolación de los valores obtenidos de las muestras.

Para cada uno de los ensayos se consideraron dos blancos: el blanco de sustrato (sólo sustrato sin fitasa) y el blanco de muestra (sin el sustrato). El blanco de sustrato se incluyó para considerar la concentración de fosfato ya presente en el sustrato liberado durante la reacción enzimática sin la acción de una fitasa al momento de realizar los cálculos de la actividad enzimática.

Para llevar a cabo la reacción enzimática se realizaron mezclas de reacción por triplicado para cada ensayo de acuerdo a la Tabla 16 empleando tubos de 2.0 mL previamente incubados a 37°C. La actividad de fitasa se midió empleando una solución de sustrato de 100 mM de Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 8.33 mM de fitato de sodio.

**Tabla 16.** Mezcla de reacción para la determinación de actividad de fitasa

<b>Blanco de sustrato</b>	<b>Volumen (μL)</b>	<b>Blanco de muestra</b>	<b>Volumen (μL)</b>	<b>Muestra</b>	<b>Volumen (μL)</b>
Buffer de actividad	40	Muestra	40	Muestra	40
Sustrato	60	Buffer de actividad	60	Sustrato	60
Total (μL)	100	Total (μL)	100	Total (μL)	100

Las mezclas de reacción junto con sus blancos correspondientes se incubaron a 37°C durante 30 minutos en un Thermomixer R (Eppendorf). La reacción se detuvo agregando 600 μL de TCA al 15%, posteriormente se agregaron 800 μL de colorante recién preparado. Se incubaron los tubos de las muestras y los blancos a 37°C por 45 min, y se midió la absorbancia a 820 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU650. Se obtuvo la cantidad de fósforo liberado interpolando el valor de la absorbancia obtenida en la recta de calibración. Los datos se registraron en una plantilla de Excel que permitió el cálculo de la actividad volumétrica enzimática empleando las siguientes ecuaciones:

$$APL = APM - ABF - ABM$$

**Ecuación 1.** Cálculo de la absorbancia generada por el fosfato liberado en la mezcla de reacción

Donde APM es la absorbancia promedio de la mezcla de reacción enzimática, ABF es la absorbancia promedio del blanco de substrato (fitato) y ABM es la absorbancia promedio del blanco de muestra.

Posteriormente, se calculó la concentración de fosfato libre (mM) en la mezcla de reacción realizando una interpolación matemática del valor de la absorbancia generada por el fosfato liberado en la mezcla de reacción (APL) en la recta de calibración, calculada previamente a través de la regresión lineal por el método de mínimos cuadrados de los valores de absorbancia y concentraciones de las soluciones estándares de fosfato.

$$x = (y - b) / m$$

**Ecuación 2.** Cálculo de fosfato libre (mM)

Donde, “x” es la concentración de fosfato libre de la muestra (mM); “y” es el valor de la absorbancia generada por el fosfato liberado en la mezcla de reacción (APL); b es el valor de la intersección con el eje “y” y “m” es la pendiente de la recta de calibración.

Finalmente se calculó la actividad volumétrica de la muestra (U/mL) de la siguiente manera:

$$AVf = \frac{x}{t} * FD * 2.5$$

**Ecuación 3.** Cálculo de la actividad volumétrica de fitasa en la muestra

Donde AVf es la actividad volumétrica de fitasa en la muestra, “x” es la concentración (mM) de fosfato libre en la mezcla de reacción, “t” es el tiempo de incubación de la reacción enzimática (30 min), FD es el factor de dilución de la muestra y 2.5 es un factor que proviene de emplear 40 µL de muestra en un volumen final de reacción de 100 µL (100/40 = 2.5). Para aceptar el valor de la actividad volumétrica final calculado se tomó en cuenta que el valor de APM estuviera por debajo de la absorbancia del estándar de valor de mayor de concentración y que x/t este comprendido entre 0.0050 y 0.083.

Para el cálculo del rendimiento actividad fitasa/biomasa ( $Y_{p/x}$ ), se dividió la actividad volumétrica de fitasa final en U/L entre la densidad celular en g/L de células secas. El  $Y_{p/x}$  se midió en unidades de fitasa producidas por gramo de biomasa (U/g).

#### **6.4. Optimización de cuatro factores que constituyen las condiciones de cultivo para incrementar la productividad volumétrica extracelular**

##### **6.4.1. Diseño del proceso de optimización empleando el método 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 para incrementar la productividad volumétrica extracelular de la fitasa FTEII en cultivos en biorreactor de *P. pastoris* regulada por el promotor *GAP*. Para el diseño Simplex Secuencial se utilizaron cuatro factores (concentración inicial de glicerol en la etapa de lote, temperatura, pH y velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )), estos se combinaron en 5 cultivos iniciales (Tabla IV), utilizando combinaciones de dos niveles en cada uno de los cuatro factores de las condiciones de cultivo:

- Concentración inicial de glicerol en la etapa de lote: 30 y 50 g/L

En la etapa de lote alimentado con glicerol:

- Temperatura: 30 y 24°C
- pH: 4 y 6
- $\mu$ : 0.2 y 0.1 h<sup>-1</sup>

Como factor de respuesta a maximizar se utilizó la productividad volumétrica extracelular de fitasa.

El proceso de optimización se realizó en tres etapas secuenciales realizando un total de siete cultivos, empezando con cinco 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 17), en las siguientes etapas, las condiciones de cultivo (los dos últimos cultivos) se establecieron al aplicar la ecuación de reflexión del método Simplex Secuencial Básico (Ecuación 4).

$$X = [2 (X_{FMC})] - FPC$$

**Ecuación 4.** Método Simplex secuencial (reflexión) para obtener nuevos valores de cada factor para las nuevas condiciones de cultivo.

Donde,  $x$  es el nuevo factor para las condiciones de cultivo;  $X_{FMC}$  es la media de los valores del factor en los cultivos de mayor productividad volumétrica fitasa y  $FPC$  es el valor del factor en el cultivo de menor productividad volumétrica de fitasa.

Después de realizados los primeros cinco cultivos (A-E), se ordenaron de menor a mayor por productividad volumétrica extracelular de fitasa, se utilizó para cada factor en las condiciones de cultivo, la ecuación para simplex secuencial (Ecuación 4), de cada factor de las condiciones de cultivo se obtuvieron valores nuevos para dos cultivos más (F y G) (Tabla 18). Posteriormente se empleó la ecuación nuevamente, pero las nuevas condiciones (H) fueron similares a los experimentos anteriores y se dio por terminado el proceso.

**Tabla 17.** Condiciones de los cinco cultivos iniciales del diseño simplex.

<b>Cultivo</b>	<b>Concentración inicial de glicerol (g/L)</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b><math>\mu</math> (h<sup>-1</sup>)</b>
A	50	6	30	0.173
B	30	4	30	0.176
C	50	6	24	0.104
D	50	4	24	0.095
E	30	6	24	0.099

**Tabla 18.** Cultivos finales del simplex con condiciones de cultivo optimizadas

<b>Cultivo</b>	<b>Concentración inicial de glicerol (g/L)</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b><math>\mu</math> (h<sup>-1</sup>)</b>
F	30	4	24	0.057
G	50	6	24	0.054

#### **6.4.2. Estrategia de cultivo en biorreactor de 7L**

Para el desarrollo de los cultivos, se utilizó un biorreactor de 7 L (Applikon Inc.), el cual posee controladores por microprocesador de potencial de hidrogeno (pH), oxígeno disuelto (OD), agitación (rpm) y temperatura (°C), los cuales funcionan por medio de un control por retroalimentación. Para los cultivos con el promotor *GAP*, la estrategia de cultivo consta de dos etapas: Crecimiento de biomasa inicial en un medio con glicerol (lote glicerol), obtención de biomasa y proteína recombinante hasta un punto delimitado a partir de la adición continua de glicerol (lote alimentado con glicerol). Se emplearon las condiciones de cultivo de la Tabla 17 y después se emplearon las de la Tabla 18, además se procuró el porcentaje de oxígeno disuelto por arriba del 25% con aire o mezclas de oxígeno-aire. Previo al inicio de cada cultivo en biorreactor, se llevaron a cabo calibraciones para las sondas de pH y de oxígeno disuelto. Previo a cada esterilización del tanque, se calibró la sonda de pH (Applikon Inc) a 2 puntos, uno a pH 4 y otro a pH 7. Una vez ajustadas las presiones de aire (entrada compresor-consola (20 psi), salida tanque-sensor (300 cm<sup>3</sup>/min), entrada al tanque (5 L/min), presión interna del tanque (1.7 psi, 120 cm H<sub>2</sub>O)), al igual que las condiciones del cultivo en el tanque, se calibró la sonda de oxígeno disuelto (Applikon Inc.) a 2 puntos, uno considerando el 100% de oxígeno disuelto en el tanque y otro considerando el 0% de oxígeno disuelto, por medio de la saturación del tanque con nitrógeno gaseoso.

#### **6.4.3. Generación de inóculos para cultivos en biorreactor**

Con el fin de obtener una concentración alta de inóculo para los posteriores, se llevó a cabo un cultivo inicial en el biorreactor de 7 L (Applikon Inc.) con 2 L de medio BMG siguiendo la metodología descrita anteriormente (Viader-Salvadó et al., 2013). Una vez preparado el medio SBG (sales basales con glicerol 1%), se vertieron 2 L de éste en el vaso del biorreactor, se calibró la sonda de pH (Applikon Inc.) y se esterilizó a 120 psi por 15 min. Se dejó enfriar y posteriormente se realizó el montaje y los debidos ajustes para el inicio del cultivo. La sonda de oxígeno disuelto (Applikon Inc.) se calibró con nitrógeno y aire. Posteriormente se inoculó la cepa suspendida en 150 mL de medio BMG (DO<sub>600nm</sub> 20) y se incubó a 30°C, pH 5, 1,249 rpm, 5 L/min de aire por ~20 h de cultivo.



Se recolectaron 5 mL de muestra cada 3 o 4 h y se determinó el crecimiento celular a través del peso húmedo y DO<sub>600</sub>. El cultivo finalizó cuando se consumió la fuente de carbono, evidenciado por un aumento de la señal del oxígeno disuelto, alcanzando una DO<sub>600nm</sub> de 13 (~23 h). Con ayuda de una bomba peristáltica (DIGI-STALTIC), se recolectó el cultivo en un recipiente estéril a través de un puerto para toma de muestra.

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 10<sup>6</sup> y 10<sup>8</sup>) 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).

#### **6.4.4. Cultivo en lote en glicerol**

Para realizar la etapa de lote de glicerol de los cultivos en biorreactor, se agregó el medio SBG (sales basales con glicerol al 3 o 5%) con 650 µL de solución antiespumante 204 (Sigma-Aldrich Co., cat. no. A8311) al tanque, delimitando a un volumen inicial de 2.5 L en cada cultivo. Posteriormente a la esterilización del tanque del biorreactor con el medio, se ajustó en el siguiente orden la temperatura a 30°C, la aireación a 5 L/min, el pH a 5.0 y la velocidad de agitación a 1249 rpm. Posteriormente se adicionaron al medio 11 mL de biotina 500X (0.02% concentración final), 11 mL de PTM1 y se calibró la sonda de oxígeno disuelto del biorreactor a 0 y 100% de saturación, y una vez ensamblado y activado el software de monitoreo, se inoculó con ~14 mL de inóculo preparado previamente. Las condiciones que se controlaron a lo largo de esta etapa fueron la temperatura a un valor de 30°C por medio de un sistema de circulación de agua, oxígeno disuelto (mayor de 25%), y pH (constante a 5.0), el cual se reguló por medio de la adición de hidróxido de amonio al 28% (NH<sub>4</sub>OH). La finalización de la etapa de lote de glicerol se evidenció por un incremento abrupto de la señal del oxígeno disuelto a causa del

consumo total de la fuente de carbono (ausencia de glicerol). Una vez observado el mínimo de la señal del oxígeno disuelto, se esperaron 45 min antes de iniciar el lote alimentado con glicerol para que la levadura lograra metabolizar completamente el glicerol restante.

#### 6.4.5. Cultivo en lote alimentado con glicerol

Esta etapa se realizó durante 10-36 h, dependiendo del cultivo realizado, se mantuvo adicionando glicerol al 60% con 12 mL/L de biotina 0.02% y 12 mL/L de PTM1 y 650 µL de antiespumante a un flujo exponencial en mL/min hasta que se completó una densidad celular de 120 g/L de células secas. Los flujos, volúmenes y tiempos de cultivo variaron en función de la velocidad específica de crecimiento requerida de acuerdo al diseño del simplex empleando un perfil de adición exponencial (Ecuación 5 y Ecuación 6).

$$F(t) = F_0 \times e^{\mu t}$$

**Ecuación 5.** Perfil exponencial de la adición de glicerol

Donde,  $F_0$  es el flujo inicial,  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento deseada y  $t$  es el tiempo .

$$F_0 = \left( \frac{\left( \left( \frac{\mu_{set}}{Y_{x/s}} \right) * \left( \frac{x \cdot V}{W_{in}} \right) \right) * 1000}{60} \right)$$

**Ecuación 6.** Calculo del flujo inicial de adición (mL/min)

Donde,  $\mu_{set}$  es la velocidad específica de crecimiento deseada,  $Y_{x/s}$  es el rendimiento biomasa/sustrato,  $x \cdot V$  es la biomasa total al final del lote y  $W_{in}$  es la concentración del glicerol para la alimentación.

Toda esta etapa se llevó a cabo a aireación constante de 5 L/min y una agitación de 1,245 rpm. Se tomaron muestras a distintos tiempos dentro de dicha etapa (~10 mL de muestra por toma), las cuales fueron centrifugadas a 14,000 rpm (18,078 g) por 5 min y los paquetes celulares y sobrenadante obtenidos se conservaron y se almacenaron a -20°C para preservar su integridad y poder realizar los análisis posteriormente que sirvieron como indicadores del comportamiento fisiológico de *P. pastoris*

Para la conservación de las células del cultivo, se obtuvieron paquetes celulares a partir de alícuotas, conteniendo 50 mg de biomasa húmeda y se conservaron en el reactivo RNAlater. El volumen ( $\mu\text{l}$ ) necesario para obtener muestras de 50 mg de biomasa se depositó en un tubo de Eppendorf de 2 ml. Cada muestra fue centrifugada a 6,000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se decantó el sobrenadante, y se agregó un volumen equivalente a 5 veces el volumen del paquete celular ( $\approx 500 \mu\text{l}$ ) del reactivo RNAlater. El paquete celular se resuspendió y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se decantó el sobrenadante. Finalmente, los tubos con cada paquete celular fueron etiquetados y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$

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  $4^{\circ}\text{C}$  para su posterior tratamiento.

#### **6.4.6. Determinación de parámetros fisiológicos de los cultivos en biorreactor**

##### **6.4.6.1. Determinación de crecimiento celular (densidad celular y velocidad específica de crecimiento)**

Para la obtención de datos relacionados al crecimiento celular, se determinó la biomasa en el cultivo a través de su densidad celular y DO600. Se tomaron 2 mL de muestra y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min, se decantaron los sobrenadantes y el paquete celular se pesó. La densidad celular se calculó con la diferencia entre el peso del tubo lleno con biomasa menos el peso del tubo vacío sobre el volumen de muestra (0.002 L) y teniendo en cuenta que 1 g de células húmedas son aproximadamente 0.25 g de células secas. A partir del valor de la densidad celular se calculó la biomasa en gramos de células secas a cada tiempo usando la siguiente ecuación (Ecuación 7).

$$x = DC * V$$

**Ecuación 7** .Cálculo de biomasa.

Donde, x es la biomasa (g); DC es la densidad celular (g/L de célula secas) y V, es el volumen de cultivo del biorreactor (L).

También se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de los cultivos en la etapa de lote alimentado glicerol a partir de la pendiente de la zona lineal del gráfico semilogarítmico natural de la biomasa en g de células secas contra el tiempo de lote alimentado (h). Para cada punto analizado, se estimó el volumen del cultivo a partir de la suma del volumen inicial, y los volúmenes añadidos de hidróxido de amonio, glicerol, y metanol al tiempo analizado, menos el volumen de cultivo muestreado.

#### **6.4.6.2. Determinación de producción extracelular de fitasa y productividad volumétrica extracelular**

Para la medición de la actividad de fitasa, se realizó el método de medición de punto final. Se midió el fosfato liberado del fitato de sodio utilizando fosfomolibdato y a través del cambio de absorbancia a 820 nm (ver punto 6.3.4). La productividad volumétrica extracelular de fitasa se calculó como unidades de fitasa generadas por hora, por cada litro de medio de cultivo

#### **6.4.6.3. Determinación de rendimiento celular proveniente del glicerol ( $Y_{x/s}$ )**

El cálculo del rendimiento celular proveniente del glicerol ( $Y_{x/s}$ ) se realizó con el cociente de la biomasa total de células secas y la cantidad en gramos de glicerol añadido, la cual se estimó con la cantidad de glicerol inicial + la cantidad de glicerol añadido durante la etapa de lote alimentado (volumen añadido de solución de glicerol en L x concentración de glicerol en g/L).

#### **6.4.6.4. Determinación de rendimiento de producción extracelular de fitasa/biomasa ( $Y_{p/x}$ )**

El cálculo del rendimiento de la producción de proteína recombinante extracelular por biomasa ( $Y_{p/x}$ ) se realizó considerando la producción de proteína recombinante extracelular sobre biomasa (g).

#### **6.4.6.5. Determinación de rendimiento de producción extracelular de fitasa proveniente de glicerol ( $Y_{p/s}$ )**

El cálculo del rendimiento de la producción de proteína recombinante extracelular por consumo de la fuente de carbono se realizó mediante el cociente de la cantidad de fitasa extracelular producida y la cantidad en gramos de glicerol añadido.

## **6.5. Determinación del impacto del proceso de optimización en la respuesta fisiológica del hospedero a condiciones de alta y baja productividad volumétrica de la proteína recombinante FTEII.**

### **6.5.1. Selección de genes y diseño de oligonucleótidos específicos.**

Para el diseño de oligonucleótidos específicos, primeramente, se seleccionaron los genes para el estudio, para lo cual se investigaron genes representativos del metabolismo del glicerol, traducción y procesos de secreción de proteínas en *P. pastoris*. Posteriormente, se realizó una búsqueda de las secuencias nucleotídicas de los genes seleccionados en la base de datos de GenBank.

Las secuencias obtenidas fueron utilizadas para el diseño de oligonucleótidos en el programa Primer3web (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Los parámetros más importantes en Primer3web para el buen diseño de los oligonucleótidos fueron: Primer Size Min 18, Opt 20, Max 36; Primer Tm Min 64, Opt 66, Max 68, Max Tm Difference 5.0, Table of thermodynamic parameters SantaLucia 1998; Product Size Ranges 100-150; Concentration of Monovalent Cations 100; Salt Correction Formula Santa Lucia 1998; Concentration of Divalent Cations 5.5; Concentration of dNTPs 1, Annealing Oligo Concentration 50.0. Adicionalmente se verificó que la Tm de los iniciadores diseñados tuvieran una Tm comprendida entre 65.8 y 68.5°C calculada con el programa OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) con la información de las siguientes concentraciones: oligonucleótido 0.3  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Na}^+$  100 mM,  $\text{Mg}^{+2}$  5.5 mM y dNTPs 1 mM.

Para evaluar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados, se realizaron alineamientos de las secuencias nucleotídicas diseñadas contra el genoma de *P. pastoris* utilizando la herramienta en línea blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para evaluar la formación de estructuras secundarias y dímeros de oligonucleótidos (“primers dimers”), se realizaron los análisis empleando la herramienta OligoAnalyzer 3.1. Este programa permite analizar la posible formación de estructuras secundarias de tipo

horquilla, homodímeros y heterodímeros. Se emplearon las secuencias de cada uno de los oligonucleótidos diseñados y se determinó el valor de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) en kcal/mol para las estructuras secundarias y dímeros de oligonucleótidos. Para determinar que no hubiera formación de estructuras secundarias que pudieran inhibir el ensayo de PCR, se verificó que el valor de  $\Delta G$  no fuera menor a -10 kcal/mol, tomando en cuenta los mismos valores de concentraciones empleados para el cálculo de la  $T_m$  con OligoAnalyzer 3.1. Una vez que se evaluaron las propiedades de los oligonucleótidos diseñados, se sintetizaron en la compañía Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, Iowa). Todos los oligonucleótidos se diseñaron para utilizar SYBR Green como agente de detección fluorogénico.

### **6.5.2. Preparación de RNA total de muestras de células obtenidas de los cultivos de alta y baja productividad volumétrica extracelular de fitasa**

Para la obtención de preparaciones de RNA a partir de las muestras conservadas previamente (punto 6.6.5), se utilizó el Kit de Promega SV Total RNA Isolation System, siguiendo el protocolo del manual de Promega. El primer paso para la extracción de RNA consistió en preparar una solución de lisis con los siguientes reactivos: 0.1 M EDTA (pH 7.4), 1 M sorbitol, 0.1%  $\beta$ - mercaptoetanol y 50 unidades de liticasa. A cada paquete celular descongelado se agregaron 100  $\mu$ L de solución de lisis y se homogenizó en un vortex durante 5-10 segundos. Las muestras fueron incubadas durante una hora a 30°C en un agitador termoestático (Thermomixer R, Eppendorf) con agitación a 350 rpm. Al terminar la incubación, se procedió a realizar la extracción de RNA de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Cada tubo de elución fue etiquetado y almacenado a -70 °C. 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 trisboratos-EDTA (TBE 1 $\times$ , Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Además, se determinó la calidad y concentración (ng/ $\mu$ L) del RNA por espectrofotometría determinando los valores de absorción a 260 y 280 nm y la relación de estos (260/280), empleando el nanoespectrofotómetro P-300 de *IMPLEN*.

Se realizaron análisis de microfluidos empleando el Bioanalizador 2100 de Agilent, el cual permite obtener información sobre el tamaño molecular, integridad y

concentración de ácidos nucleicos de 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 µL de “RNA 6000 Nano Gel Matrix” en un filtro, el cual fue centrifugado a 15,000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron alícuotas de 65 µL del gel filtrado en microtubos. Posteriormente, se prepararon mezclas de gel-colorante, para lo cual se homogenizó por vortex el colorante concentrado durante 10 segundos, centrifugó (spin) y se agregó 1 µL de colorante a una alícuota de 65 µL de gel filtrado. Nuevamente se homogenizó por vortex y centrifugó (spin) a temperatura ambiente. Esta mezcla se cargó en el nano chip de RNA pipeteando 9.0 µL de la mezcla gel-colorante en el pocillo marcado con G, el cual está conectado con el émbolo de la estación de preparación del chip. Se cerró la tapa de la estación de preparación verificando que el émbolo se encontrara en la posición de 1 ml, y se empujó el émbolo de la jeringa completamente. Se aseguró el clip para sostener la jeringa y se esperaron 30 segundos antes de soltar el clip. Una vez que se soltó el clip se esperaron 5 segundos y se estiró suavemente el émbolo a la posición de 1 ml. Se abrió la tapa de la estación y se cargaron 9.0 µL en los demás pozos marcados con Gs. Posteriormente, se pipetearon 5 µL de nano marcador RNA 6000 en los 12 pozos para muestras y en el pocillo para el marcador (ladder). Por último, se agregó 1 µL del marcador y 1 µL de cada una de las muestras a analizar, depositando la muestra en el pocillo correspondiente. El nano chip de RNA se llevó a vortex durante 1 minuto a 2400 rpm, se colocó el nano chip en el equipo y se inició el programa 2100 Expert de Agilent. Una vez terminado el programa, se analizaron las concentraciones de RNA obtenidas y el número de integridad de las muestras de RNA (RIN) para cada una de las muestras de todos los cultivos realizados de las dos condiciones.

Para eliminar cualquier contaminación con DNA de las muestras de RNA seleccionadas, se realizó un tratamiento con una enzima DNasa, empleando el Kit de Promega RQ1 RNase-Free DNase, trabajando en un ambiente limpio y libre de nucleasas, empleando material nuevo y libre de RNasas. El primer paso para realizar el tratamiento con DNasa consistió en mezclar 3 µg de RNA a tratar, agua libre de RNasas, 2 µL de Buffer de reacción y 2 µL de enzima RQ1 RNase-Free DNase en tubos de 0.2 ml (Tabla II). La mezcla se incubó en un termociclador durante 1 hora a 37°C (Tabla III). Una vez terminada la incubación, se agregaron 2 µL de solución de paro de DNasa y se incubó de nuevo la muestra en un termociclador durante 15 minutos a 65°C.

**Tabla 19.** Mezcla de reacción para el tratamiento del RNA con RQ1 DNasa libre de RNasa.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µL)</b>
Solución RNA	(Variable, 3µg totales)
Buffer de DNasa RQ1 10X	3.0
Agua libre de nucleasas	(Variable)
RQ1 DNasa (1 U/mL)	3.0
Volumen final	30.0

**Tabla 20.** Condiciones para el ensayo de DNasa.

<b>Ciclos</b>	<b>Duración del ciclo</b>	<b>Temperatura</b>
1	60 min	37°C
1	15 min	65°C

Para la síntesis del DNAc se utilizó el kit de Agilent AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis. A partir de las muestras de RNA tratadas con DNasa, se realizaron ensayos de retrotranscripción para cada una de las muestras. El primer paso consistió en realizar una mezcla agregando en orden para una preparación: 150 ng totales de RNA, 1 µL de oligo(dT) (0.5 µg/µL) y agua libre de RNasas, necesaria para obtener un volumen final de 15.7 µL (Tabla 21). La mezcla fue incubada en un termociclador durante 5 minutos a 65°C (Tabla 22). Una vez terminada la incubación, se dejó enfriar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de proseguir con el ensayo. Mientras tanto, se realizó una segunda mezcla agregando en orden para una preparación: 2.0 µL de



buffer de reacción, 0.8  $\mu\text{L}$  de mix de dNTP's (25 mM) y 0.5  $\mu\text{L}$  de inhibidor de ribonucleasas (40 U/ $\mu\text{L}$ ) (Tabla 21). Esta mezcla se mezcló con la primera. Por último, se agregó 1  $\mu\text{L}$  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 22). 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. Una vez obtenidas las muestras de DNAc, se realizaron diluciones seriadas 1:5 y 1:25 empleando agua libre de nucleasas en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . El material fue etiquetado y las muestras fueron almacenadas a -70°C.

**Tabla 21.** Mezcla de reacción para la síntesis de DNAc (1 preparación).

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Solución de RNA	Variable (150 ng totales)
Oligo dT	1.0
Agua libre de RNasas	Ajustar a 20 $\mu\text{L}$
Buffer Affinity Script	2.0
dNTP's	0.8
RNase Block	0.5
Enzima Affinity Script	1.0
Volumen final	20.0

**Tabla 22.** Condiciones del ensayo de síntesis de DNAc.

<b>Ciclos</b>	<b>Duración del ciclo</b>	<b>Temperatura</b>
1	5 min	65°C
1	10 min	24°C
1	1 h	42°C
1	15 min	70°C

### **6.5.3. Ensayos de qPCR para determinar la eficiencia y el intervalo de linealidad de los genes seleccionados**

Para el análisis de expresión de genes, las muestras de DNAc se cuantificaron por qPCR con el equipo Swift Spectrum 48 Real Time Thermal Cyclers (Esco Healthcare) y se

emplearon los kits Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR & QRT-PCR (*Agilent Technologies*) y Brilliant III Ultra-Fast QPCR & QRT-PCR (*Agilent Technologies*). También se empleó el colorante de referencia pasiva ROX, en los ensayos de qPCR realizados. Los oligonucleótidos empleados fueron disueltos en 1 mL de agua ultrapura libre de nucleasas y se agitaron 12 h a temperatura ambiente con ayuda de un balancín. Posteriormente, se prepararon alícuotas de trabajo de 100  $\mu$ L a una concentración final de 3  $\mu$ M y se guardaron a -20°C.

Para determinar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados, se realizaron ensayos de qPCR para obtener las curvas de disociación por duplicado para cada par de oligonucleótidos empleando dilución 1:25 de la muestra calibradora (proveniente del tiempo 0 del lote alimentado con glicerol). Se preparó un coctel de reacción con los siguientes reactivos: 10  $\mu$ L de Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green, 2  $\mu$ L de cada oligonucleótido, 4.0  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, 2.0  $\mu$ L de DNAc dilución 1:25. Se preparó por duplicado para cada par de oligonucleótidos. Las mezclas fueron realizadas en tubos de 0.65 mL, se distribuyeron 18.0  $\mu$ L de cada mezcla en tiras de tubos ópticos especiales de 8X, y se agregaron los 2.0  $\mu$ L de la dilución de DNA correspondiente. Finalmente, los tubos fueron cerrados con tiras de tapas ópticas especiales de 8X. Todos los tubos con las mezclas realizadas fueron centrifugados en una minicentrífuga durante 10 segundos y colocados en la placa del equipo. Las condiciones del ensayo están la Tabla 23.

**Tabla 23.** Condiciones del ensayo de qPCR para SYBR Green

Ciclos	Duración	Temperatura
1	3 minutos	95°C
40	20 segundos	95°C
	20 segundos	60°C
	1 minuto	95°C
1	30 segundos	55°C
	30 segundos	95°C

Para determinar la eficiencia de la reacción (E), linealidad ( $R^2$ ) y los intervalos de linealidad de los ensayos de qPCR, se realizaron ensayos de qPCR de 5 diluciones seriadas 1:5 de DNAc proveniente de la muestra calibradora (tiempo 0 de lote alimentado con glicerol). Se preparó un coctel de reacción con los siguientes reactivos: 10  $\mu$ L de Brilliant

III Ultra-Fast SYBR Green, 2  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido, 3.7  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 0.3  $\mu\text{L}$  de ROX (1:500), 2.0  $\mu\text{L}$  de DNAc. También se realizó un coctel de reacción similar para los ensayos de qPCR con sondas de hidrolisis (*FTEII* y *GAP*). Cada reacción se realizó por duplicado para cada dilución. Los volúmenes totales para las mezclas están descritos en las Tabla 24 y Tabla 25 respectivamente. Las mezclas fueron realizadas en tubos de 0.65 mL, se distribuyeron 18.0  $\mu\text{L}$  de cada mezcla en tiras de tubos ópticos especiales de 8X, se agregaron los 2.0  $\mu\text{L}$  de la dilución de DNA correspondiente. Finalmente, los tubos fueron cerrados con tiras de tapas ópticas especiales de 8X.

De la misma manera, se realizó una mezcla de reacción para el control negativo empleando 5  $\mu\text{L}$  del Brilliant III Ultra fast SYBR Green qPCR Master Mix, 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido y 3  $\mu\text{L}$  de agua estéril libre de nucleasas. La mezcla se realizó directamente en un tubo óptico especial. Finalmente, el tubo fue cerrado con una tapa óptica especial.

**Tabla 24.** Volúmenes de la mezcla de reacción para los ensayos de qPCR para la recta de eficiencia de amplificación con SYBR Green con todos los oligonucleótidos en estudio, excepto *GAP* y *FTEII*.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (1X) (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volumen (12X) (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix	10.0	120.0
Oligonucleótido 5´	2.0	24.0
Oligonucleótido 3´	2.0	24.0
Agua estéril libre de nucleasas	3.7	44.4
DNA	2.0	-
ROX (dilución 1:500)	0.3	3.6
Volumen final	20.0	216.0

Todos los tubos con las mezclas realizadas fueron centrifugados en una minicentrífuga durante 10 segundos y colocados en la placa del equipo Swift Spectrum 48 Real Time Thermal Cyclers (Esco Healthcare). Se emplearon las mismas condiciones de la Tabla 23 para los ensayos realizados con SYBR Green.

**Tabla 25.** Volúmenes de la mezcla de reacción para los ensayos de qPCR para las rectas de eficiencia de amplificación con las sondas de hidrólisis para el gen *GAP* y *FTEII*

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (1X) (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volumen (12X) (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Brilliant III Ultra-Fast qPCR Master Mix	10.0	120.0
Kit PrimeTime Mini GAP o FTEII	4.0	48.0
Agua estéril libre de nucleasas	3.7	44.4
ROX (1:500)	0.3	3.6
DNA	2.0	-
Volumen final	20.0	216.0

De la misma manera, se realizó una mezcla de reacción para el control negativo empleando 5  $\mu\text{L}$  del Brilliant III Ultra fast qPCR Master Mix, 2  $\mu\text{L}$  del Kit PrimeTime Mini y 3  $\mu\text{L}$  de agua estéril libre de nucleasas. La mezcla se realizó directamente en un tubo óptico especial. Finalmente, el tubo fue cerrado con una tapa óptica especial.

Todos los tubos con las mezclas realizadas fueron centrifugados en una minicentrífuga durante 10 segundos y fueron colocados en la placa del equipo Swift Spectrum 48 Real Time Thermal Cyclers (Esco Healthcare). Se emplearon las condiciones de la Tabla 26.

**Tabla 26.** Condiciones del ensayo de qPCR utilizando sondas de hidrólisis.

<b>Ciclos</b>	<b>Duración</b>	<b>Temperatura</b>
1	3 minutos	95°C
40	20 segundos	95°C
	20 segundos	60°C

Para el procesamiento de la información obtenida de RT-qPCR, se utilizó el programa propio del termociclador fqdpcr versión 4.2.10 y el programa LinReg.PCR versión 2017.1. Los datos fueron exportados en hojas de Excel y se introdujeron en una plantilla de Excel para realizar los cálculos correspondientes de eficiencia,  $R^2$  y el intervalo de linealidad de cada gen analizado.

#### **6.5.4. Determinación de los niveles de expresión de los genes seleccionados en los cultivos de alta y baja productividad volumétrica de fitasa extracelular**

Se determinaron por RT-qPCR los niveles relativos de expresión de 19 genes, involucrados con el metabolismo de glicerol, traducción y la ruta de secreción de proteínas en la cepa *P. pastoris* KM71GAHFTEII en cultivos de alta (G) y baja (A) productividad volumétrica de fitasa extracelular.

Para los ensayos de RT-qPCR, se empleó el DNAc correspondiente a cada muestra de los cultivos A y G sintetizado previamente (ver punto 6.5.2). Para la determinación de los niveles de expresión de los genes analizados, se empleó la cuantificación relativa y el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (ver sección de Apéndices). Como muestra calibradora se empleó la muestra correspondiente al tiempo 0 del lote alimentado con glicerol y como genes normalizadores *G6PD* y *YPT1*. En los ensayos de qPCR realizados se analizaron todos los tiempos de ambos cultivos con el mismo gen al mismo tiempo.

Se realizó una mezcla de reacción con los componentes de la Tabla 27 de la misma manera descrita previamente. Las mezclas fueron realizadas en tubos de 0.65 mL, se distribuyeron 18.0  $\mu$ L de la mezcla en tiras de tubos ópticos especiales de 8X, se agregaron los 2.0  $\mu$ L de la muestra de DNAc diluida 1:25 correspondiente. Finalmente, los tubos fueron cerrados con tiras de tapas ópticas especiales de 8X. También se realizaron mezclas de reacción para los controles negativos de PCR y de retrotranscripción como se describió previamente en el punto 6.7.3. Todos los tubos con las mezclas realizadas fueron centrifugados en una minicentrífuga durante 10 segundos y colocados en la placa del equipo Swift Spectrum 48 Real Time Thermal Cyclers (Esco Healthcare). Se emplearon las mismas condiciones de la Tabla 23 para los ensayos realizados con SYBR Green.

**Tabla 27.** Volúmenes de mezcla de reacción para los ensayos de qPCR con SYBR Green de los 19 genes en estudio en las muestras obtenidas de los cultivos A y G.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (1X) (µL)</b>	<b>Volumen (20X) (µL)</b>
Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix	10.0	200.0
Oligonucleótido 5'	4.0	40.0
Oligonucleótido 3'	4.0	40.0
Agua estéril libre de nucleasas	3.7	74.0
ROX (1:500)	0.3	6.0
DNA	2.0	-
Volumen final	20.0	360.0

De manera similar, se realizaron los ensayos correspondientes para los genes *FTEII* y *GAP*. Los volúmenes empleados en las mezclas de reacción se muestran en la Tabla 28.

Las mezclas fueron realizadas en tubos de 0.65 mL, se distribuyeron 18.0 µL de la mezcla en tiras de tubos ópticos especiales de 8X, se agregaron los 2.0 µL de la muestra de DNAC diluida 1:25 correspondiente. Finalmente, los tubos fueron cerrados con tiras de tapas ópticas especiales de 8X. También se realizaron mezclas de reacción para los controles negativos de PCR y de retrotranscripción como se describió previamente en el punto 6.7.3. Todos los tubos con las mezclas realizadas fueron centrifugados en una minicentrífuga durante 10 segundos y colocados en la placa del equipo Swift Spectrum 48 Real Time Thermal Cyclers (Esco Healthcare). Se emplearon las condiciones de la Tabla 26.

**Tabla 28.** Volúmenes de mezcla de reacción para los ensayos de qPCR con sondas de hidrolisis (*GAP* y *FTEII*) de las muestras obtenidas de los cultivos A y G.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (1X) (µL)</b>	<b>Volumen (20X) (µL)</b>
Brilliant III Ultra-Fast qPCR Master Mix	10.0	200.0
Kit PrimeTime Mini GAP o FTEII	4.0	80.0
Agua estéril libre de nucleasas	3.7	74.0
ROX (1:500)	0.3	6.0
DNA	2.0	-
Volumen final	20.0	360.0

Para el procesamiento de la información obtenida de RT-qPCR, se utilizó el programa propio del termociclador fqdpcr versión 4.2.10 y el programa LinReg.PCR versión 2017.1. Los datos fueron exportados en hojas de Excel y se introdujeron en una plantilla de Excel para realizar los cálculos correspondientes para la determinación de los niveles de expresión relativa.

#### **6.5.5. Comparación de los niveles de expresión de los genes seleccionados con la respuesta fisiológica del hospedero**

Una vez determinado el estado fisiológico de la cepa en las dos condiciones de cultivo, se realizó la comparación de los niveles de expresión de los genes seleccionados con la respuesta fisiológica del hospedero. Se realizó una gráfica comparativa de promedios los niveles de expresión relativos de cada gen de cada cultivo.

#### **6.5.6. Análisis estadístico**

Se realizaron análisis estadísticos de comparación de medias mediante una prueba t de Student para dos muestras independientes sin asumir varianzas iguales con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$  (Minitab® 19.2) para comparar los niveles de expresión relativa para cada gen en las dos condiciones de cultivo.

## 7. RESULTADOS

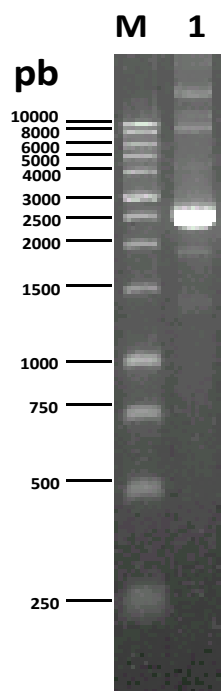
### 7.1. Construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del gen heterólogo *FTEII* regulado por el promotor *GAP*

#### 7.1.1. Obtención de DNA plasmídico de *E. coli* JM109 pGAHFTEIV y pGEMFTEIIAOX

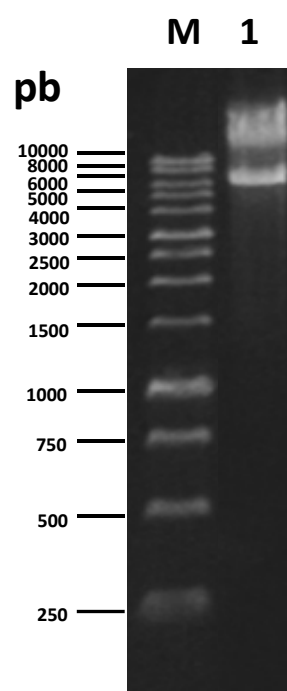
En la

Figura 3, se muestra el análisis en geles de agarosa para verificar la integridad del DNA plasmídico pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV obtenido de células de *E. coli*. En los carriles correspondientes se presentan las diversas conformaciones del DNA para cada plásmido, libre de RNA. La obtención de las bandas confirmó la integridad del DNA plasmídico aislado.

A)



B)

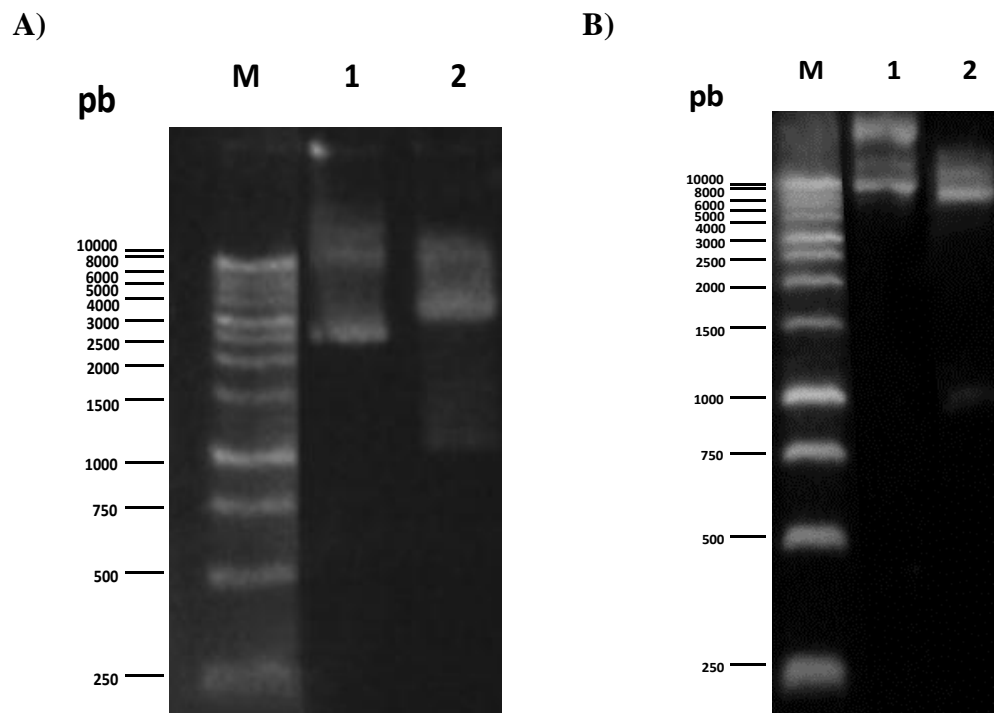


**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de preparaciones de DNA plasmídico a mediana escala de pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV. A) M: marcador de 1 kb DNA Ladder. Carril 1: DNA plasmídico pGEMFTEIIAOX. B) M: marcador de 1 kb DNA Ladder. Carril 1: DNA plasmídico pGAHFTEIV.



En la Figura 4, se muestra el análisis en geles de agarosa del ensayo de digestión enzimática con las enzimas *XhoI* y *NotI*. En el carril 2 de la Figura 4A, se observan las bandas esperadas de 1087 y 3464 pb que confirmó la identidad del vector pGEMFTEIIAOX.

En el carril 2 de la Figura 4B, se observan las bandas esperadas de 1087 y 7493pb que confirmó la identidad del vector pGAHFTEIV

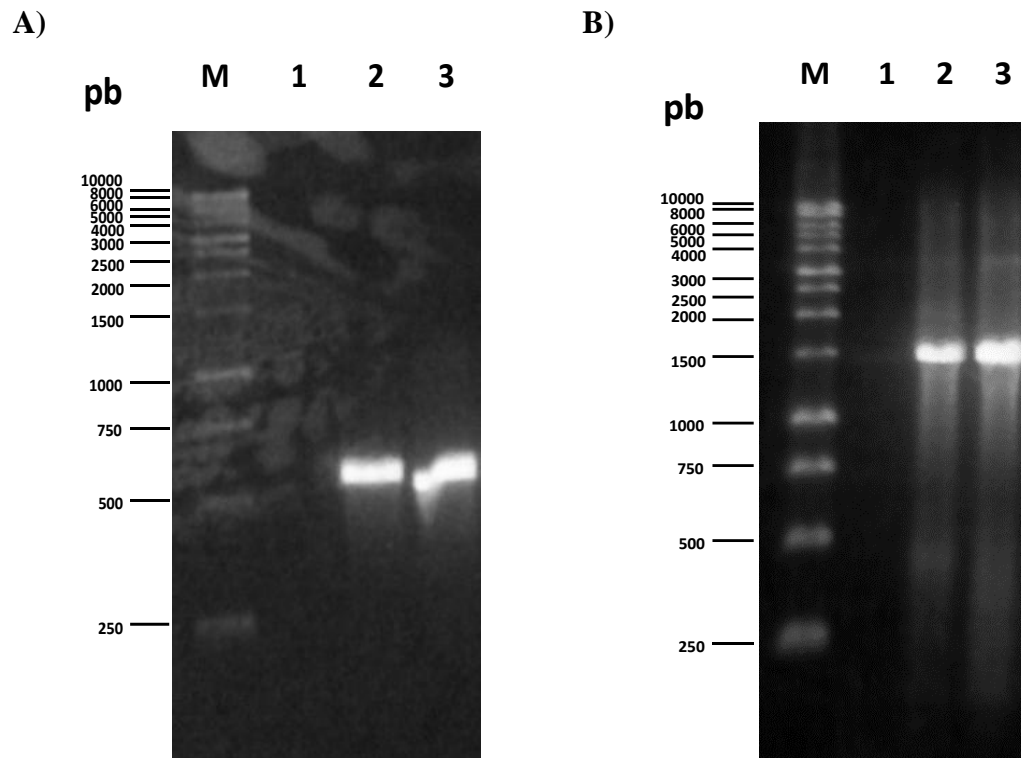


**Figura 4.** . Electroforesis en geles de agarosa al 0.8% del análisis de restricción con las enzimas *XhoI* y *NotI*. de pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV. A) M: marcador de 1 kb DNA Ladder. Carril 1: DNA plasmídico pGEMFTEIIAOX; Carril 2: pGEMFTEIIAOX digerido con *XhoI* y *NotI*. B) M: marcador de 1 kb DNA Ladder. Carril 1: DNA plasmídico pGAHFTEIV; Carril 2: pGAHFTEIV digerido con *XhoI* y *NotI*.

En la

Figura 5 se muestra el análisis en geles de agarosa del ensayo de PCR de los plásmidos pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV. En la Figura 5A, se muestra el PCR con los oligonucleótidos FTE1 y FTE2 del plásmido pGEMFTEIIAOX. La presencia de una única banda de 536 pb en el producto amplificado de la muestra (carril 3), que corresponde a una región del gen *FTEII*, confirmó la identidad del plásmido pGEMFTEIIAOX.

En la Figura 5B, se muestra el PCR con los oligonucleótidos pGAPF y 3AOX del plásmido pGAHFTEIV. La presencia de una única banda de 1475 pb en el producto amplificado de la muestra (carril 3), que corresponde con parte del promotor *GAP* y de la región terminadora de *AOX*, confirmó la identidad del plásmido pGAHFTEIV.



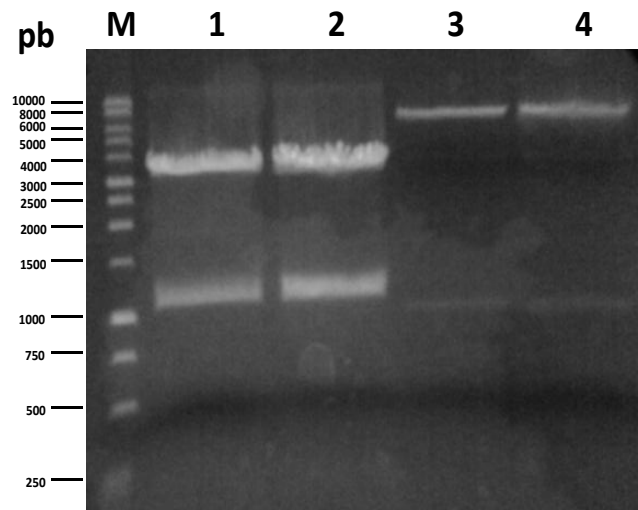
**Figura 5.** Electroforesis en geles de agarosa al 0.8% del ensayo de PCR para la caracterización de los plásmidos pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV. A) M: marcador de 1 kb DNA Ladder. Carril 1: control negativo de la PCR; Carril 2: control positivo de la PCR (DNA genómico de *P. pastoris* KM71FTEII) Carril 3: pGEMFTEIIAOX. B) M: marcador de 1 kb DNA Ladder. Carril 1: control negativo de la PCR; Carril 2: control positivo de la PCR (DNA genómico de *P. pastoris* KM71GAPFTEII) Carril 3: pGAHFTEIV.

### 7.1.2. Construcción del plásmido pGAHFTEII y transformación en *E.coli* TOP10

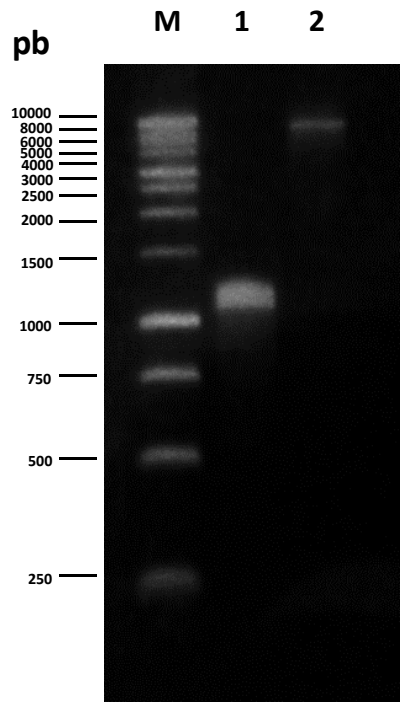
En la Figura 6 se muestra la digestión preparativa de pGEMFTEIIAOX con *XhoI* y *NotI* (carriles 1 y 2) que generó dos fragmentos, uno de 3464 pb, correspondiente al vector pGEM, y otro de 1087 pb correspondiente al gen *FTEII*. La digestión preparativa de pGAHFTEIV con *XhoI* y *NotI* (carriles 3 y 4) generó dos fragmentos de 7499 y 1081 pb.

En la Figura 7 se muestra la purificación de los fragmentos correspondientes al fragmento *FTEII* y al vector pGAH. La purificación de la banda de 1081 pb (carril 1)

condujo a obtener 1750 ng y de la purificación correspondiente a la banda de 7499 pb, se obtuvieron 1000 ng que se emplearon en la ligación subsecuente.

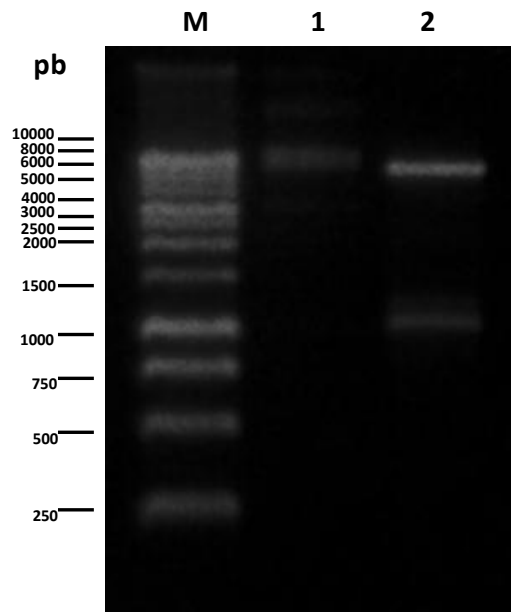


**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la digestión preparativa de pGEMFTEIIAOX y pGAHFTEIV con *XhoI* y *NotI*. M: marcador de 1 kb DNA Ladder. Carriles 1-2: pGEMFTEIIAOX digerido con *XhoI* y *NotI*; Carriles 3-4: pGAHFTEIV digerido con *XhoI* y *NotI*.



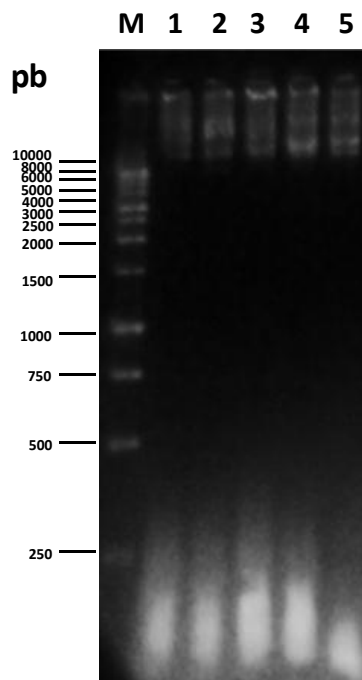
**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de los fragmentos purificados para llevar a cabo la ligación. M: marcador de 1 kb DNA Ladder. Carril 1: fragmento de 1081 pb del fragmento *FTEII*. Carril 2: fragmento de 7499pb vector pGAH.

La Figura 8 muestra la electroforesis del ensayo de ligación del vector pGAH con el fragmento *FTEII* (carril 1). Se observó la presencia de bandas que no se encontraban en el control negativo de ligación (fragmentos a ligar sin ligasa, carril 2), además se observó la ausencia de la banda correspondiente al fragmento *FTEII* y no se mostraron signos de degradación de los fragmentos utilizados, lo cual indicó que se llevó a cabo la ligación.



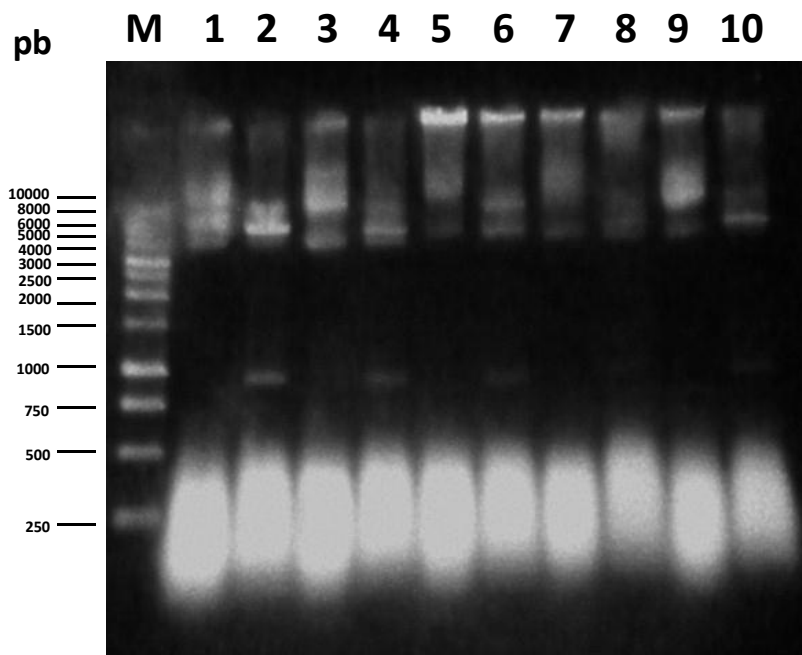
**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la ligación del vector pGAH con el fragmento *FTEII*. M: marcador de 1 kb DNA Ladder. Carril 1: vector pGAH y fragmento de *FTEII* con DNA ligasa T4 después de 3 h de incubación a temperatura ambiente. Carril 2: vector pGAH y fragmento de *FTEII* sin DNA ligasa T4 (control negativo de ligación).

En la Figura 9 se muestra el DNA plasmídico obtenido de cinco colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con el producto de ligación anterior. La obtención de bandas sin degradación confirmó la integridad del DNA plasmídico aislado. Además, se observaron claramente las distintas conformaciones características de los plásmidos. Asimismo, también se observó la presencia de RNA degradado en las muestras.



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de pGAHFTEII. M: marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder. Carriles 1-5: DNA plasmídico de cinco colonias obtenidas durante la transformación de *E. coli* TOP10 con el producto de ligación de pGAH y el fragmento FTEII.

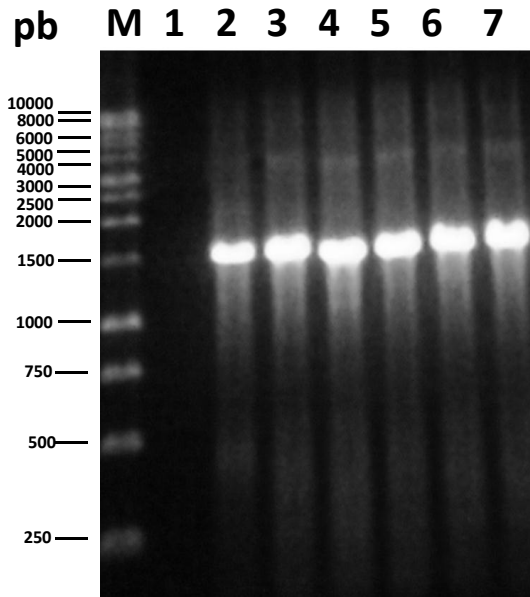
En la Figura 10 se muestra el análisis de digestión enzimática con las enzimas *XhoI* y *NotI*. En los carriles 2, 4, 6, 8, y 10 se muestra la digestión de pGAHFTEII mediante el empleo de las dos enzimas (*XhoI* y *NotI*), lo cual generó dos fragmentos, uno de 7499 pb correspondiente al vector pGAH y otro de 1081 pb correspondiente al fragmento de FTEII. Además, se observa la presencia de DNA sin cortar, lo que indica que se presentó una digestión parcial debido a la presencia de RNA en los ensayos.



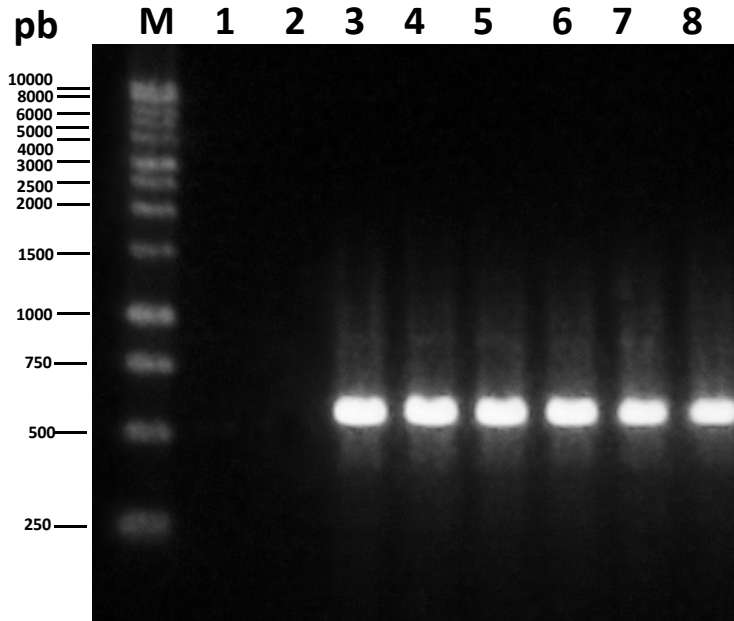
**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización enzimática del plásmido pGAHFTEII con *XhoI* y *NotI*. M: marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder. Carriles 1, 3, 5, 7 y 9: controles negativos de corte (pGAHFTEII sin digerir). Carriles 2, 4, 6, 8 y 10: pGAHFTEII digerido con *XhoI* y *NotI*.

En la Figura 11 se muestra el resultado del PCR con los oligonucleótidos pGAPF y 3AOX de los plásmidos aislados (pGAHFTEII). La presencia de una única banda de 1475 pb en el producto amplificado de las muestras (carriles 3-7) corresponde con parte del promotor *GAP* y de la región terminadora de *AOX*, lo cual indica que el plásmido obtenido contiene al menos la secuencia del promotor *GAP* y un fragmento insertado entre la región promotora y el terminador.

En la Figura 12 se muestra el resultado del PCR con los oligonucleótidos FTE1 y FTE2 de los plásmidos aislados (pGAHFTEII). El PCR del plásmido pGAHFTEIV (carril 2) no mostró la banda de 536 pb ya que los oligonucleótidos empleados no hibridan en el gen *FTEIV*. Los plásmidos aislados mostraron la banda de 536 pb, lo cual confirma que se trata del plásmido pGAHFTEII.



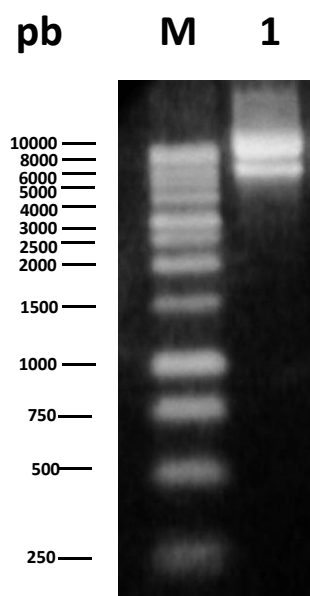
**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización por PCR con los iniciadores pGAPF y 3AOX del plásmido pGAHFTEII construido. M: marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder. Carril 1: control (-) de la PCR. Carril 2: control positivo (DNA pGAHFTEIV). Carriles 3 - 7: DNA plasmídico pGAHFTEII de cinco colonias de *E. coli* transformadas.



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización por PCR con los iniciadores FTE1 y FTE2 del plásmido pGAHFTEII construido. M: marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder. Carril 1: control (-) de la PCR. Carril 2: control negativo 2 (DNA pGAHFTEIV). Carril 3: control positivo (DNA pGEMFTEIIAOX). Carriles 4 - 8: DNA plasmídico pGAHFTEII de cinco colonias de *E. coli* transformadas.

### 7.1.3. Preparación a mediana escala del plásmido pGAHFTEII y transformación de *P. pastoris* KM71

En la Figura 13 se muestra el análisis en geles de agarosa para verificar la integridad del DNA plasmídico pGAHFTEII. Se presentan las diversas conformaciones del DNA, libre de RNA. La obtención de las bandas confirmó la integridad del DNA plasmídico aislado.

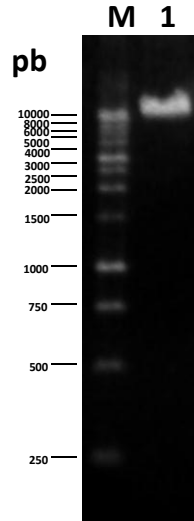


**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de preparaciones de DNA plasmídico a mediana escala de pGAHFTEII. M: marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder. Carril 1: DNA plasmídico pGAHFTEII.

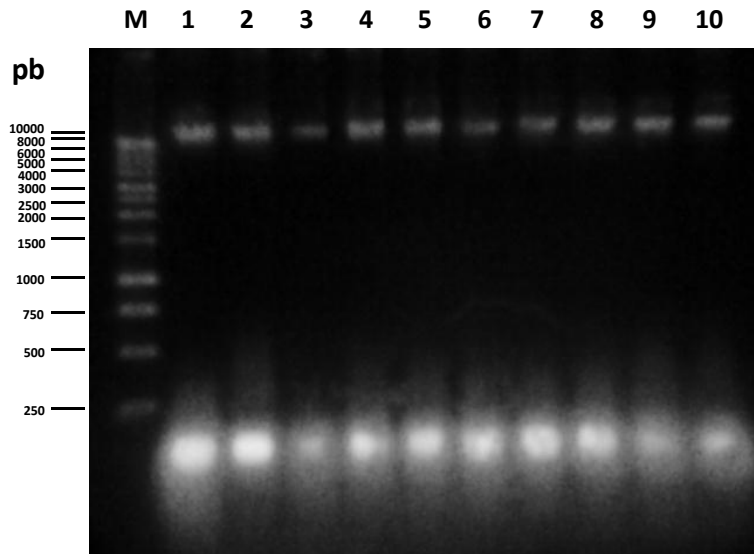
En la Figura 14 se muestra el análisis en gel de agarosa del plásmido pGAHFTEII linearizado con la enzima de restricción *SalI*, para verificar el corte total del vector. Este vector se empleó para transformar células químicamente competentes de *P. pastoris*. La obtención de una banda bien definida de 8580 pb demostró el corte total del plásmido.

Después de la electroporación de la cepa de *P. pastoris* KM71 con el vector pGAHFTEII previamente linearizado, se obtuvieron más de 200 clonas His<sup>+</sup> con características morfológicas de *P. pastoris*, de las cuales se analizaron 70 clonas (solo se presentan diez). La Figura 15 muestra el análisis en gel de agarosa para verificar la integridad de los DNA genómicos aislados de 10 colonias de *P. pastoris* cepa KM71 transformadas con el vector pGAHFTEII linearizado previamente con *SalI*. La obtención de bandas intensas y definidas demostró la integridad de todos los DNA genómicos aislados.





**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de la digestión enzimática con la enzima *SaII*. M: marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder. Carril 1: pGAHFTEII linearizado con la enzima *SaII*.

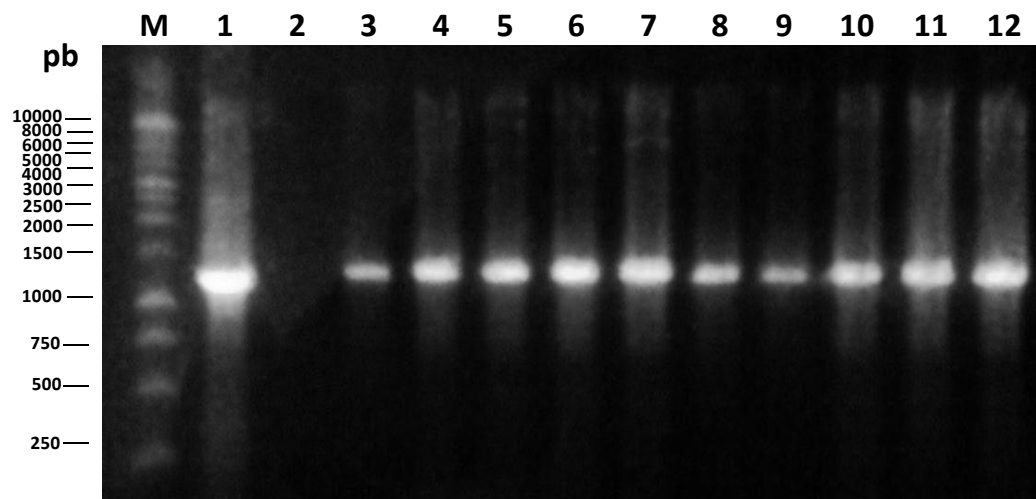


**Figura 15.** Electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en TBE 1X de DNA genómico aislado de cepas de *P. pastoris* KM71 transformadas con el vector pGAHFTEII. M: marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder. Carriles 1-10: DNA genómico aislado de cepas KM71 transformadas con el vector pGAHFTEII linearizado con *SaII*.

#### 7.1.4. Caracterización genotípica de las cepas recombinantes de *P. pastoris* KM71GAHFTEII

La caracterización genotípica del DNA genómico de las colonias transformadas con el plásmido pGAHFTEII se llevó a cabo mediante la confirmación por PCR de la presencia del casete de expresión empleando la combinación de los oligonucleótidos pGAPF y FTE2.

En la Figura 16 se muestra el análisis de electroforesis de la caracterización por PCR de las clonas KM71GAHFTEII (clonas 1-10) con los iniciadores pGAPF y FTE2. La presencia de una única banda de 1310 pb confirmó la integración del casete de expresión en el genoma de la levadura.



**Figura 16.** . Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización por PCR con los iniciadores pGAPF y FTE2 del DNA genómico aislado de las colonias de cepas KM71GAHFTEII. M: marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder. Carril 1: control positivo de PCR (DNAp pGAHFTEII). Carril 2: control negativo de PCR. Carriles 3-12: DNA genómico de las colonias transformantes His<sup>+</sup> de *P. pastoris* KM71GAHFTEII.

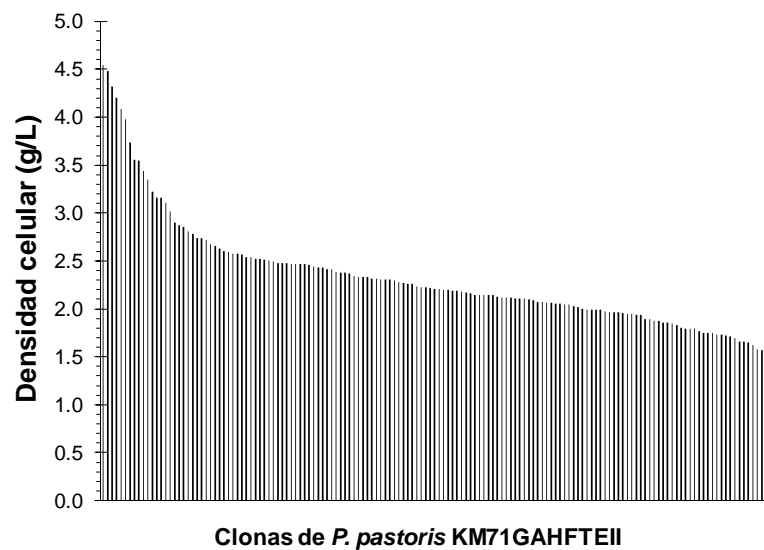
### 7.2. Selección de cepas de *P. pastoris* sobreproductoras de la proteína recombinante FTEII regulada por el promotor GAP

#### 7.2.1. Cultivos en tubo agitado

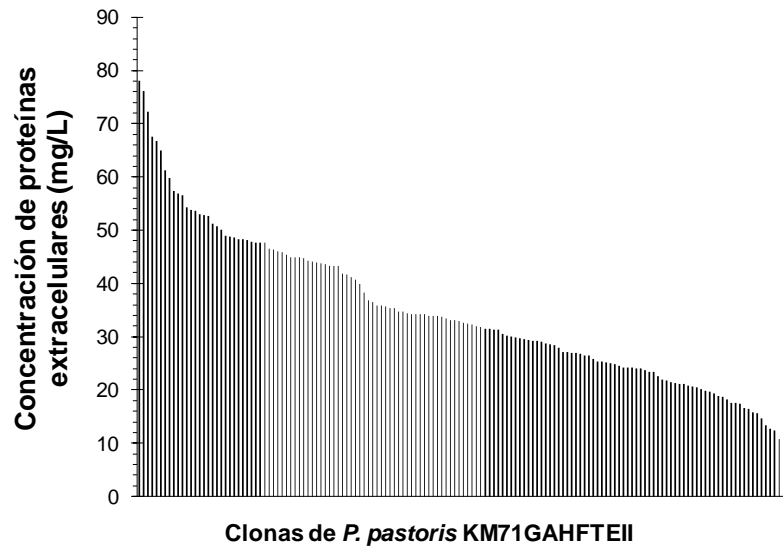
En la Figura 17 se muestra el crecimiento celular de 151 clonas de *P. pastoris* KM71GAHFTEII. En la Figura 18 se muestra la concentración de proteínas extracelulares y en la Figura 19, se muestra el rendimiento proteínas extracelulares/biomasa. Los cultivos

de 10 mL de las 151 clonas analizadas mostraron una densidad celular entre 1.44 y 4.54 g/L de células secas, y una concentración de proteínas extracelulares de 9.8 a 78.1  $\mu\text{g/mL}$ , lo cual representó un rendimiento proteínas extracelulares/biomasa en un intervalo de 3 a 46 mg/g.

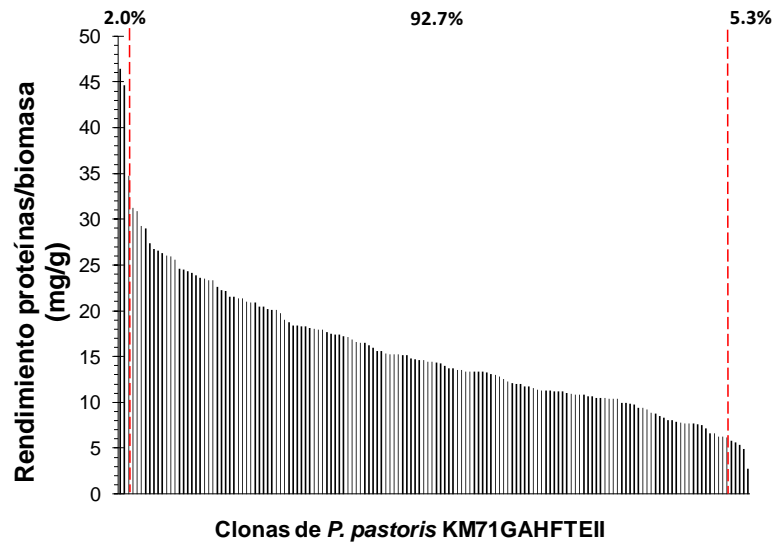
Sólo 3 (2%) de las 151 cepas analizadas se consideraron como sobreproductoras de la proteína heteróloga por mostrar un rendimiento proteínas/biomasa mayor al 75% respecto al obtenido por la cepa que generó el mayor rendimiento, es decir mayor a 35 mg/g. El 92.7% (140 de 151) de las cepas analizadas se consideraron como intermedias y el resto (8 cepas, 5.3%), se consideraron como cepas de bajo rendimiento.



**Figura 17.** Crecimiento celular de 151 clonas de *P. pastoris* KM71GAHFTEII en medio BMG-CaCl<sub>2</sub> a las 30 h de cultivo, ordenadas de mayor a menor densidad celular.



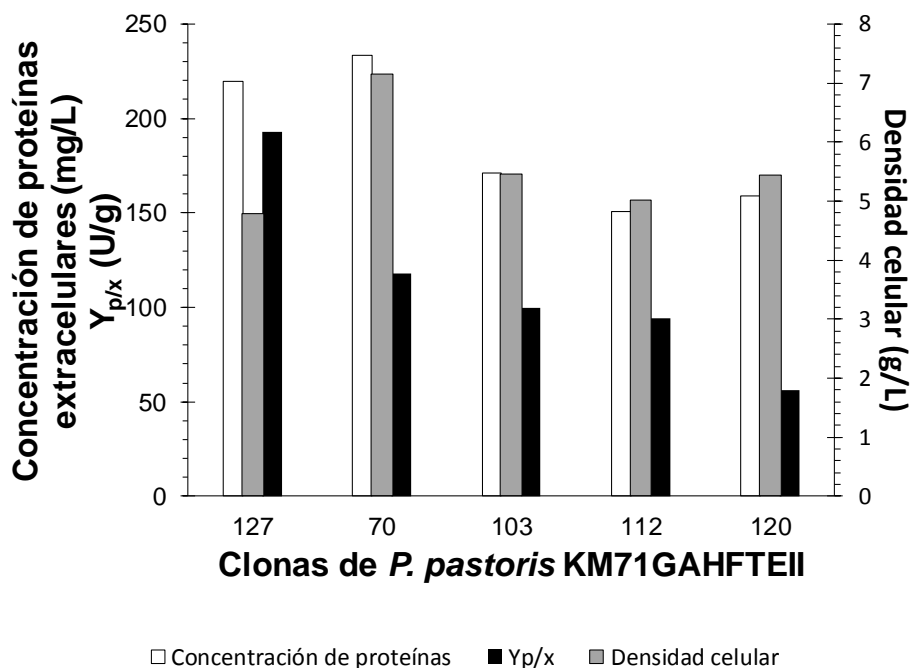
**Figura 18.** Concentración de proteínas extracelulares de 151 clonas de *P. pastoris* KM71GAHFTEII en medio BMG-CaCl<sub>2</sub> a las 30 h de cultivo, ordenadas de mayor a menor.



**Figura 19.** Rendimiento proteínas extracelulares/biomasa de 151 clonas de *P. pastoris* KM71GAHFTEII en medio BMG-CaCl<sub>2</sub> a las 30 h de cultivo, ordenadas de mayor a menor.

### 7.2.2. Cultivos en matraz

Los cinco cultivos realizados en matraz de las cepas seleccionadas mostraron una concentración de proteínas extracelulares de 150.8 a 233.6  $\mu\text{g/mL}$ , una densidad celular de 4.78 a 7.16 g/L de células secas, una actividad volumétrica extracelular de fitasa de 0.3 a 0.9 U/mL, que representa un rendimiento actividad de fitasa/biomasa ( $Y_{p/x}$ ) de 56 a 193 U/g (Figura 20).



**Figura 20.** Concentración de proteínas extracelulares, densidad celular y  $Y_{p/x}$  de cinco clonas de *P. pastoris* KM71GAHFTEII en medio BMG-CaCl<sub>2</sub> a las 30 h de cultivo, ordenadas de mayor a menor  $Y_{p/x}$ .

La clona seleccionada como sobreproductora de fitasa (clona 127) mostró un rendimiento proteínas/biomasa 16 veces mayor con respecto a la que obtuvo el menor rendimiento de las 151 clonas analizadas, y un  $Y_{p/x}$  3.4 veces mayor que el cultivo de menor  $Y_{p/x}$  de los cinco cultivos realizados en matraz.

### 7.3. Optimización de cuatro factores que constituyen las condiciones de cultivo para incrementar la productividad volumétrica extracelular

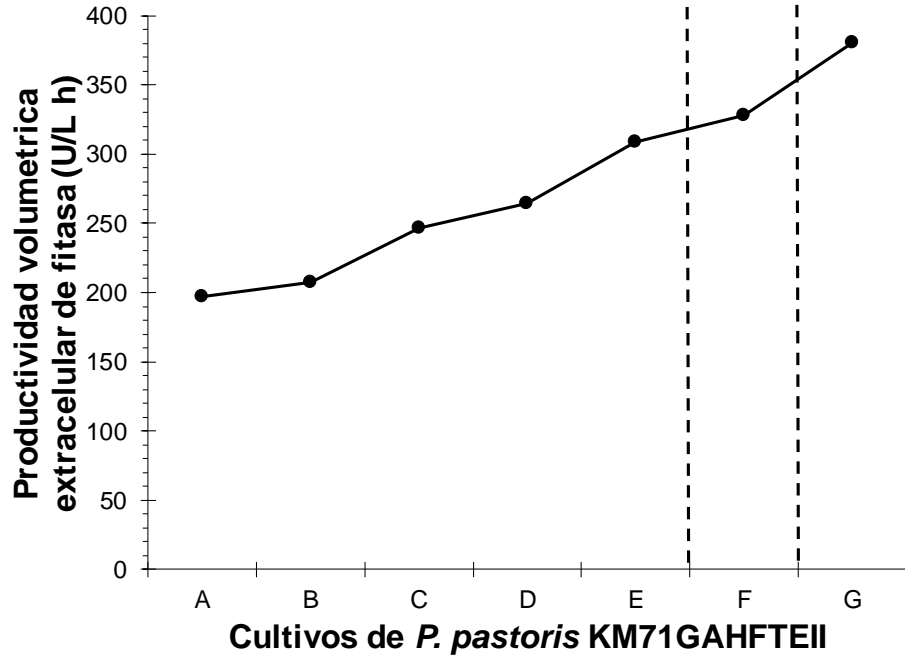
#### 7.3.1. Diseño del proceso de optimización empleando el método simplex secuencial

El proceso de optimización se realizó en tres etapas secuenciales realizando un total de siete cultivos. Los cultivos A al E constituyeron la primera etapa, en los que se establecieron las condiciones de cultivo según un diseño factorial simplificado con dos niveles para cada factor. La productividad volumétrica máxima obtenida en esta etapa fue de 309 U/L h (Tabla 29). La producción volumétrica extracelular de fitasa fue de 5,687 a 12,747 U/L de cultivo. Las condiciones de cultivo de la segunda etapa condujeron a una productividad volumétrica de 328 U/L h (Tabla 29). La producción volumétrica extracelular de fitasa fue de 18,914 U/L. En la tercera etapa, se obtuvo la productividad volumétrica máxima del proceso de optimización de 384 U/L h. La producción volumétrica extracelular de fitasa fue de 19,945 U/L de cultivo. Utilizando la ecuación de reflexión nuevamente se obtuvieron nuevas condiciones de cultivo (Cultivo H) pero al ser muy parecidas a las de los cultivos anteriores se dio por terminado el método de optimización en el cultivo G (Tabla 29).

El proceso de optimización condujo a usar una concentración de glicerol de 50 g/L en la etapa de lote, pH 6, 24°C y  $\mu$  0.056 h<sup>-1</sup>. Con estas condiciones de cultivo, la productividad volumétrica extracelular de fitasa fue dos veces mayor que la del cultivo con menor productividad volumétrica (Figura 21).

**Tabla 29.** Producción, producción volumétrica y productividad volumétrica extracelular de fitasa de cada cultivo realizado.

Cultivo	Concentración inicial de glicerol (g/L)	pH	Temperatura (°C)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Producción volumétrica (U/L de cultivo)	Productividad volumétrica (U/L h)
A	50.0	6	30	0.173	5,687	197
B	30.0	4	30	0.176	5,305	208
C	50.0	6	24	0.104	9,008	247
D	50.0	4	24	0.095	10,604	265
E	30.0	6	24	0.099	12,747	309
F	30.0	4	24	0.057	18,914	328
G	50.0	6	24	0.054	19,945	384
H	23.33	5.67	20.00	0.04	-	-

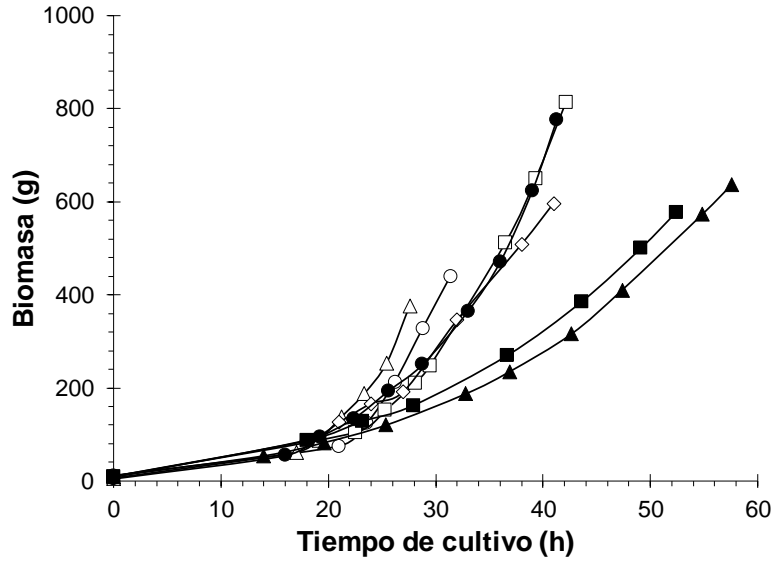


**Figura 21.** Productividad volumétrica de fitasa extracelular de los cultivos de los siete cultivos con la cepa KM71GAHFTEII. Los cultivos están ordenados de menor a mayor productividad volumétrica de fitasa extracelular. Las líneas punteadas dividen las etapas de optimización.

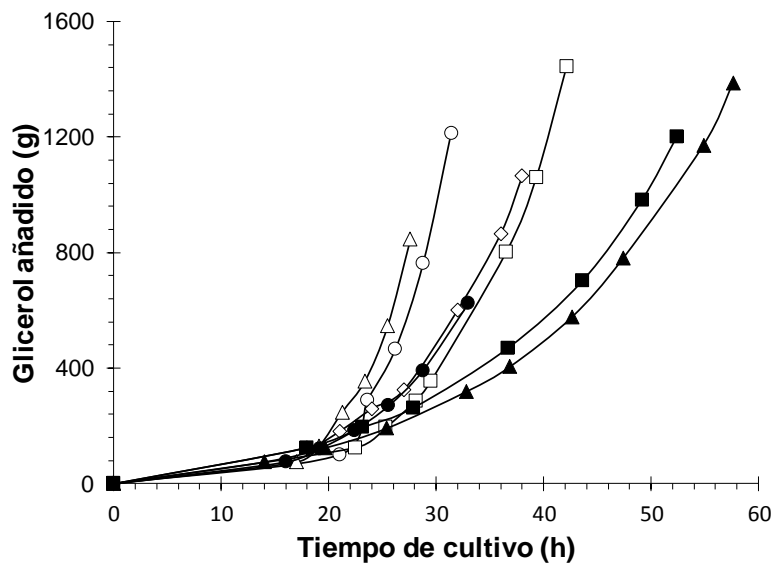
### 7.3.2. Comportamiento de parámetros fisiológicos de los cultivos en biorreactor

#### 7.3.2.1. Crecimiento celular y consumo de glicerol

En la Figura 22 se muestra el crecimiento celular de los siete cultivos a lo largo del tiempo del cultivo. Los cultivos realizados con 50 g/L de glicerol, alcanzaron densidades celulares entre 31.2-37.1 g/L de células secas, mientras que los realizados con 30 g/L de glicerol fue de 20.7-23.8 g/L de células secas. Durante los cultivos realizados, la densidad celular incrementó de manera exponencial de 8.4 a 813 g de células secas. En la Figura 23 se muestra el perfil de alimentación de glicerol para obtener la velocidad específica de crecimiento determinada para cada experimento propuesto por el método simplex.



**Figura 22.** Crecimiento celular a lo largo del tiempo de cultivo en los siete cultivos realizados. (○): A, (△): B, (□): C, (◇): D, (●): E, (▲): F, (■): G).



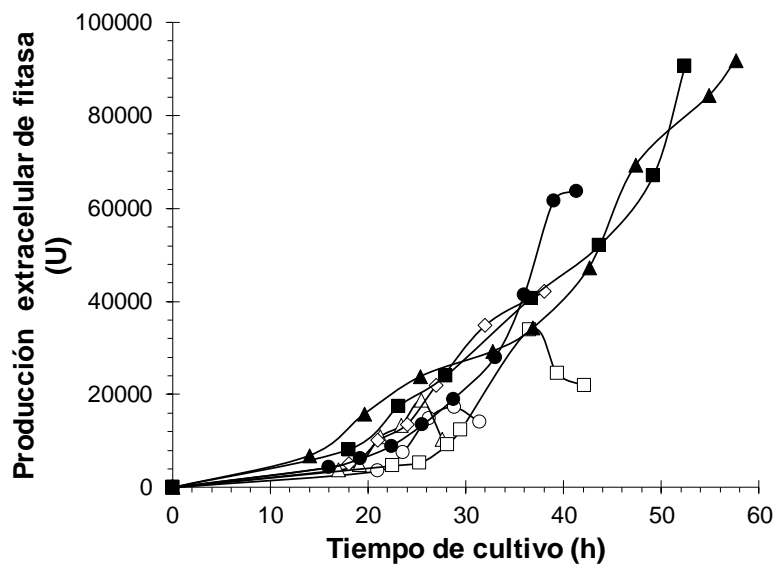
**Figura 23.** Perfil de alimentación exponencial de glicerol en los siete cultivos realizados. (○):A, (△):B, (□):C, (◇):D, (●):E, (▲):F, (■):G).



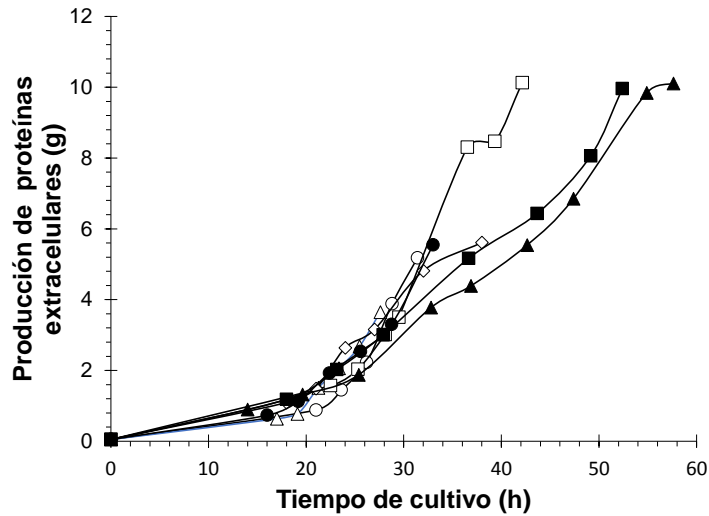
### 7.3.2.2. Producción de fitasa extracelular

La producción de fitasa extracelular en los cinco cultivos que constituyeron la primera etapa del proceso de optimización, mostró un pico de producción de fitasa máximo y después disminuye en las últimas horas del cultivo (Figura 24). La producción de fitasa extracelular fue de 17,221 U a 63,653 U. Los cultivos F y G mostraron una producción de fitasa extracelular de 91,787 y 90,612 U, respectivamente.

En la Figura 25 se muestra el perfil de producción de proteínas extracelulares, donde se observa que no hay una disminución en la cantidad de proteína extracelular en los cultivos de la primera etapa del proceso de optimización, como sucede con la actividad de fitasa, lo que indica que existe lisis celular en los cultivos A al E, que corresponden a la primera parte del proceso de optimización.



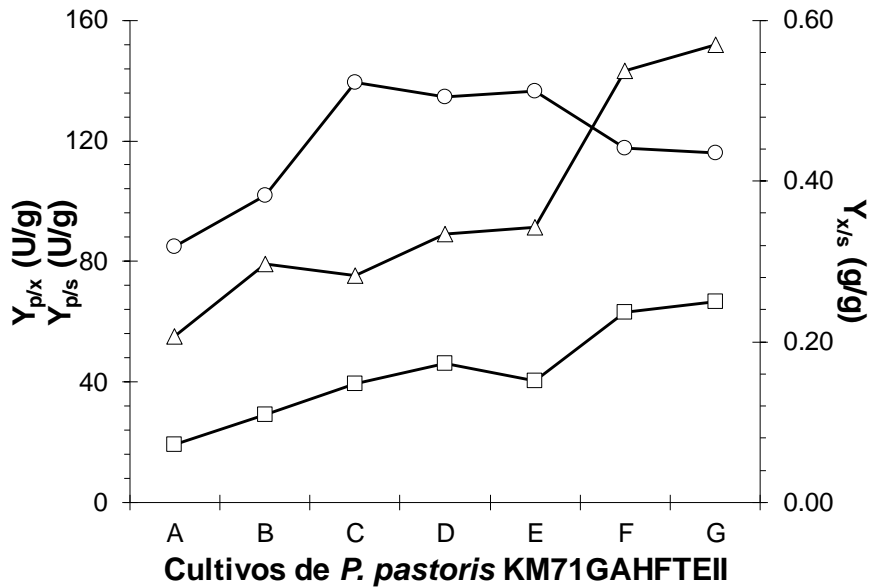
**Figura 24.** Producción de fitasa extracelular a lo largo del tiempo de cultivo en los siete cultivos realizados. (○): A, (△): B, (□): C, (◇): D, (●): E, (▲): F, (■): G.



**Figura 25.** Producción de proteínas extracelulares a lo largo del tiempo de cultivo en los siete cultivos realizados. (○): A, (△): B, (□): C, (◇): D, (●): E, (▲): F, (■): G.

### 7.3.2.3. Comportamiento de los tres rendimientos $Y_{x/s}$ , $Y_{p/x}$ y $Y_{p/s}$ durante el proceso de optimización

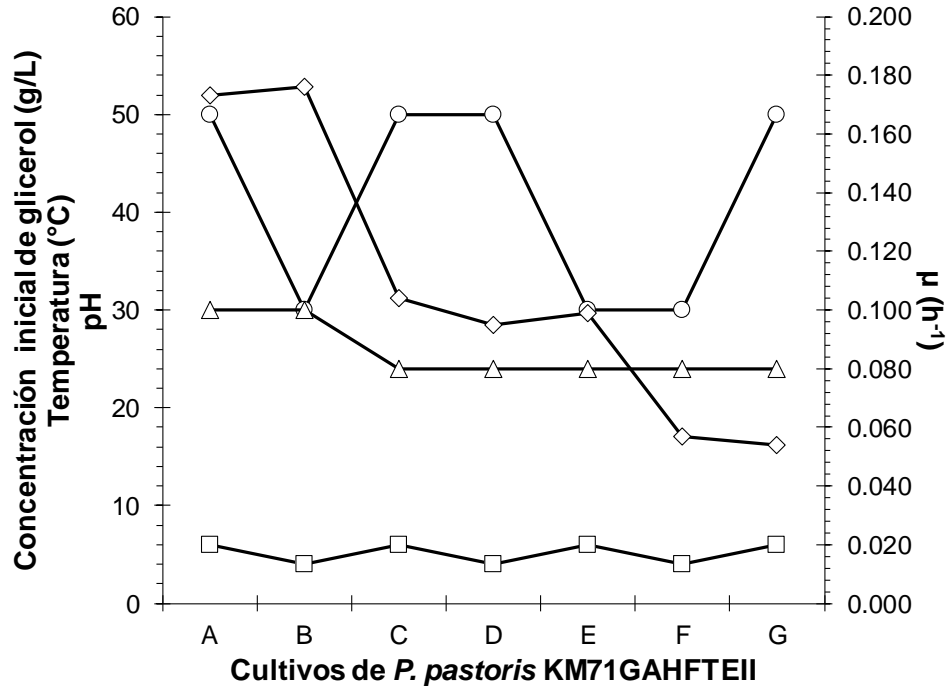
Durante el proceso de optimización, el  $Y_{x/s}$  fue aumentando desde 0.37 g/g hasta valores entre 0.51 g/g para posteriormente estabilizarse a valores de 0.41 g/g (Figura 26). El  $Y_{p/x}$  inició en 55 U/g, fue aumentando paulatinamente y de forma más rápida en los dos últimos cultivos hasta llegar a un valor de 152 U/g (Figura 26), lo que indica que la eficiencia celular para producir la fitasa recombinante de forma extracelular fue aumentando durante el proceso de optimización. El  $Y_{p/s}$  fue aumentando progresivamente de 19 hasta 67 U/g, valores globales a partir del lote de glicerol de 14 a 74 U/g, lo cual repercute en una disminución de 5 veces el costo del proceso, ya que la fuente de carbono (glicerol) es el componente del medio de cultivo que más impacta en dicho costo (alrededor del 80% del costo total de todas las materias primas).



**Figura 26.** Rendimiento celular proveniente del glicerol,  $Y_{x/s}$  (○); rendimiento de producción extracelular de fitasa/biomasa,  $Y_{p/x}$  (△); y rendimiento de producción extracelular de fitasa proveniente de glicerol,  $Y_{p/s}$  (□) durante el proceso de optimización. Los cultivos están ordenados de menor a mayor productividad volumétrica extracelular de fitasa.

#### 7.3.2.4. Comportamiento de las condiciones de cultivo durante el proceso de optimización

Durante el proceso de optimización, tanto la concentración inicial de glicerol como el pH en el lote alimentado con glicerol fueron oscilando entre 30-50 g/L y 4-6 (Figura 27), respectivamente, lo cual indica que estos dos factores no mostraron un gran impacto en la productividad volumétrica del proceso. Sin embargo, la temperatura y la velocidad específica de crecimiento tendieron a ir bajando a medida que aumentaba la productividad volumétrica extracelular de fitasa. La temperatura y la velocidad específica de crecimiento disminuyeron de 30°C y 0.176 h<sup>-1</sup> a 24°C y 0.054 h<sup>-1</sup>. Por lo tanto, de los cuatro factores estudiados, la temperatura y la velocidad específica de crecimiento fueron los factores que más influyeron en la productividad volumétrica y lo hicieron de forma inversamente proporcional.



**Figura 27.** Comportamiento de las condiciones de cultivo durante el proceso de optimización. Los cultivos están ordenados de menor a mayor productividad volumétrica extracelular de fitasa. Concentración inicial de glicerol (○), temperatura (Δ), pH (□) y velocidad específica de crecimiento,  $\mu$  (◇)

#### **7.4. Determinación el impacto del proceso de optimización en la respuesta fisiológica del hospedero a condiciones de alta y baja productividad volumétrica de la proteína recombinante FTEII**

##### **7.4.1. Selección de genes y diseño de oligonucleótidos específicos**

Se seleccionaron y diseñaron un total de 12 genes relacionados con los procesos de traducción, secreción y metabolismo de glicerol: los genes *RPS8A* y *RPS26B* que codifican para proteínas pertenecientes a la subunidad ribosomal pequeña 40S; el gen *GUT1* que codifica para la glicerol quinasa, que convierte el glicerol en glicerol 3-fostato; el gen *DAK2* que codifica para la dihidroxiacetona quinasa, involucrada en el metabolismo de dihidroxiacetona; el gen *PGK* que codifica para la 3-fosfoglicerato quinasa, enzima clave en el proceso de glicólisis; el gen *SEC63* que codifica para una parte esencial del complejo SEC63 involucrado en la translocación de las proteínas al retículo endoplásmico; el gen *CPR5* que codifica para la peptidil-prolil cis-trans isomerasa, cataliza la isomerización cis-trans de enlaces peptídicos en residuos de prolina; el gen

*PRES5* que codifica para la subunidad alfa 6 del proteosoma 20S; el gen *BET2* que codifica para la subunidad beta de la geranilgeranil transferasa requerida para el transporte vesicular entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi; el gen *COPI* que codifica para la subunidad alfa del coatómero del complejo vesicular COPI; el gen *ATG4* que codifica para una cisteína proteasa requerida para la autofagia que corta a la proteína ATG8 a una forma requerida para la formación del autofagosoma y generación de vesículas, y el gen *ATG8* que codifica para un componente de los autofagosomas y vesículas. Además, también se seleccionaron otros genes relacionados al proceso de secreción previamente analizados en el laboratorio (Fernández-Cano, 2015): *MPG1* que codifica para una GDP manosa pirofosforilasa, importante durante la biosíntesis de la pared celular; el gen *PMT2* que codifica para la O-manosiltransferasa que está involucrada en la O-glicosilación en el retículo endoplásmico y en los fenómenos de UPR y ERAD; el gen *KAR2* que codifica para la chaperona BiP, proteína principal responsable del plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico; el gen *RSP5* que codifica para la ubiquitina ligasa, involucrada en la degradación mediada por ubiquitinación; el gen *SSO2* que codifica para t-SNARE involucrado en la fusión de vesículas secretoras en la membrana plasmática; el gen *GAP* que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, enzima de la glicólisis; y el gen heterólogo *FTEII* que codifica para la fitasa FTEII. Se usaron como genes normalizadores el gen 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 12 pares de oligonucleótidos específicos en base a las secuencias genómicas reportadas en el GenBank (Tabla 30).

En la evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos, 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 (Figura 28).

En la evaluación de la formación de estructuras secundarias de tipo horquilla, homodímeros y heterodímeros, no se encontraron valores de  $\Delta G$  menores a -10 kcal/mol en ninguno de los oligonucleótidos (Tabla 31).

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
SEC63	40.1 bits (20)	0.42	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Plus	42.1 bits (21)	0.11	21/21 (100%)	0/21 (0%)	Plus/Minus
	Query 1	CCTACACCTCCTACGCCAGG 20 				Sbjct 836414	AGACACCAGCATCTCCACCT 21 			
ATG4	46.1 bits (23)	0.007	23/23 (100%)	0/23 (0%)	Plus/Plus	46.1 bits (23)	3e-06	23/23 (100%)	0/23 (0%)	Plus/Minus
	Query 1	GGCTGGGGGTAGAAAAAGTGAAC 23 				Sbjct 2361486	GGCTGGGGGTAGAAAAAGTGAAC 2361508 			
ATG8	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Plus	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Minus
	Query 1	AGTTTGCAGCCGTATCCCC 20 				Sbjct 1394605	AGTTTGCAGCCGTATCCCC 1394624 			
COPI	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Plus	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Minus
	Query 1	GCTGGGATCTCGGTGACGAA 20 				Sbjct 1119400	GCTGGGATCTCGGTGACGAA 1119419 			
PGK	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Plus	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Minus
	Query 1	GCAAAGGTCGGTGAAGCCAC 20 				Sbjct 1944166	GCAAAGGTCGGTGAAGCCAC 1944185 			
PRES	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Plus	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Minus
	Query 1	ATCACAAAGCGGGTAGAACGC 20 				Sbjct 543313	ATCACAAAGCGGGTAGAACGC 543332 			
CPR5	42.1 bits (21)	4e-05	21/21 (100%)	0/21 (0%)	Plus/Minus	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Plus
	Query 1	TCCGGTAGTGCTCCAAGGAA 21 				Sbjct 1068568	TCCGGTAGTGCTCCAAGGAA 1068548 			
BET2	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Plus	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Minus
	Query 1	AACTGACCCCGAAGTGGTG 20 				Sbjct 1464092	AACTGACCCCGAAGTGGTG 1464111 			
GUT1	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Minus	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Plus
	Query 1	TTGCTGCCGTTTTGGTGTC 20 				Sbjct 1526346	TTGCTGCCGTTTTGGTGTC 1526327 			
RPS8A	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Plus	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Minus
	Query 1	AGTCTGGTCGTCAAGGTGCC 20 				Sbjct 1365674	AGTCTGGTCGTCAAGGTGCC 1365693 			
RPS26B	44.1 bits (22)	8e-06	22/22 (100%)	0/22 (0%)	Plus/Plus	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Minus
	Query 1	TGCACTACTGTGTTTCTGTGC 22 				Sbjct 670378	TGCACTACTGTGTTTCTGTGC 670399 			
DAK2	42.1 bits (21)	3e-05	21/21 (100%)	0/21 (0%)	Plus/Plus	40.1 bits (20)	1e-04	20/20 (100%)	0/20 (0%)	Plus/Minus
	Query 1	GCCACAAGAAAGCTCGAAGCC 21 				Sbjct 1632084	GCCACAAGAAAGCTCGAAGCC 1632104 			

**Figura 28.** Alineamientos en blastn de los oligonucleótidos diseñados con su secuencia blanco correspondiente en el genoma de *P. pastoris*

**Tabla 30.** Genes seleccionados y secuencia de oligonucleótidos específicos.

Número de acceso GenBank	Gen	Proteína	Tamaño secuencia (pb)	Oligonucleótido 5'	Oligonucleótido 3'	Tamaño Amplicón (pb)
XM_002494183.1	<i>GUT1</i>	Glicerol quinasa	1866	ttgctgccggttttgggtgc	cgctcgctcaatgtggccttg	141
XM_002493026.1	<i>DAK2</i>	Dihidroxiacetona quinasa	1827	gccacaagaaagctcgaagcc	gcggcaagaccaatagcacc	116
XM_002490366.1	<i>PGK</i>	3-fosfoglicerato quinasa	1251	gcaaaggtcggtagaacccac	tcagcgatggtagctgcgaa	104
XM_002490052.1	<i>RPS8A</i>	Proteína de la subunidad ribosomal pequeña RPS8Ap	603	agtctggctgcaaggtgcc	ccctcggatgccaagagaa	130
XM_002491217.1	<i>RPS26B</i>	Proteína de la subunidad ribosomal pequeña RPS26B	360	tgcactactgtgttctctgtgc	agccttcttggcagcttcag	143
XM_002493779.1	<i>SEC63</i>	Subunidad esencial del complejo Sec63	1995	cctacacctctacgccagg	agacaccagcatcttccacct	133
XM_002489874.1	<i>CPR5</i>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	669	tccggtagtctccaaaggaa	tggcctcggcgtaatctca	106
XM_002491139.1	<i>PRE5</i>	Subunidad alfa 6 de proteosoma 20S	834	atcacaagcgggtagaacgc	gtctctcagggcaagcaagc	100
XM_002492948.1	<i>BET2</i>	Subunidad beta tipo II geranilgeraniltransferasa	1002	aactgacccccgaagtgggtg	gctgcaacgcaaacaaacac	127
XM_002489906.1	<i>COPI</i>	Subunidad alfa del complejo vesicular COPI	3621	gctgggatctcggtagacgaa	cagcagcagtgctccattc	129
XM_002490609	<i>ATG4</i>	Cisteína-proteasa conservada	1596	ggctgggggtagaaaaagtgaac	ccgtagaagtaatgcgaggaaca	118
XM_002494100.1	<i>ATG8</i>	Componente de los autofagosomas	378	agtttgcggaccgtatcccc	actggcccacagtaggtcg	108

**Tabla 31.** Análisis de la formación de estructuras secundarias de tipo horquilla, homodímero y heterodímero de las secuencias de los oligonucleótidos diseñados.

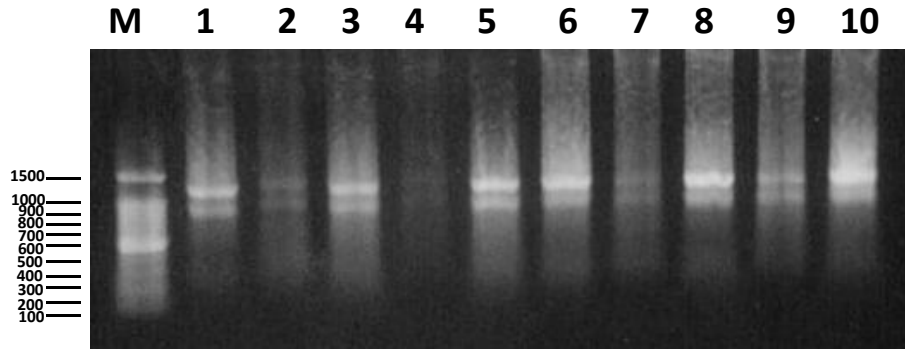
Gen	Oligonucleótido	$\Delta G$		
		Horquilla	Homodímero	Heterodímero
<i>SEC63</i>	5'	-1.34	-4.67	-4.67
	3'	0.63	-3.17	
<i>ATG4</i>	5'	0.12	-3.14	-3.14
	3'	-0.96	-3.61	
<i>CPR5</i>	5'	-0.31	-9.75	-6.68
	3'	-0.99	-9.28	
<i>PRE5</i>	5'	-2.42	-6.75	-3.17
	3'	-0.27	-3.14	
<i>BET2</i>	5'	-1.12	-4.41	-6.68
	3'	-5.1	-6.75	
<i>ATG8</i>	5'	-1.67	-6.68	-5.99
	3'	-2.53	-9.28	
<i>COPI</i>	5'	-2.79	-5.19	-6.69
	3'	-1.81	-5.09	
<i>PGK</i>	5'	-1.29	-3.61	-5.19
	3'	-3.29	-6.69	
<i>GUT1</i>	5'	-0.93	-9.75	-6.21
	3'	-0.18	-9.28	
<i>RPS8A</i>	5'	0.51	-3.61	-5.02
	3'	-1.41	-3.61	
<i>RPS26B</i>	5'	-2.98	-7.05	-5.09
	3'	-3.88	-6.34	
<i>DAK2</i>	5'	-1.42	-6.76	-6.21
	3'	-1.24	-3.61	

#### 7.4.2. Preparación de RNA total de muestras de células obtenidas de los cultivos de alta y baja productividad volumétrica extracelular de fitasa

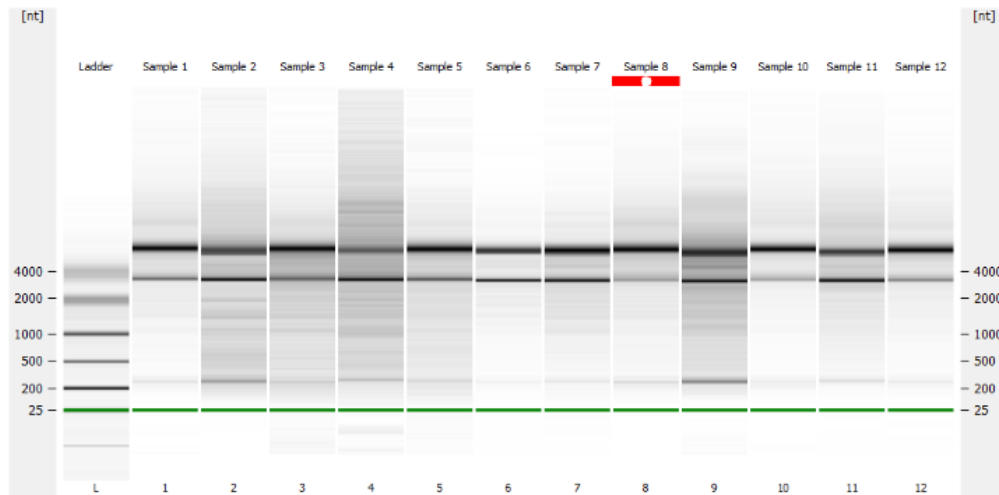
En la Figura 29 y Figura 30 se muestran los análisis de integridad del RNA total de las muestras obtenidas de los cultivos de alta y baja productividad volumétrica tanto en geles de agarosa como en las electroforesis digitales obtenidas con el Bioanalyzer 2100. En ambos casos, se verificó la integridad de las muestras ya que presentaron las bandas características del RNA ribosomal 18S y 26S, además se observó la presencia de DNA genómico degradado con barrido hacia arriba de las bandas de RNA (Figura 29).

El análisis posterior al tratamiento con DNAsa en geles de agarosa muestra la desaparición del barrido de DNA en la parte superior (Figura 31).

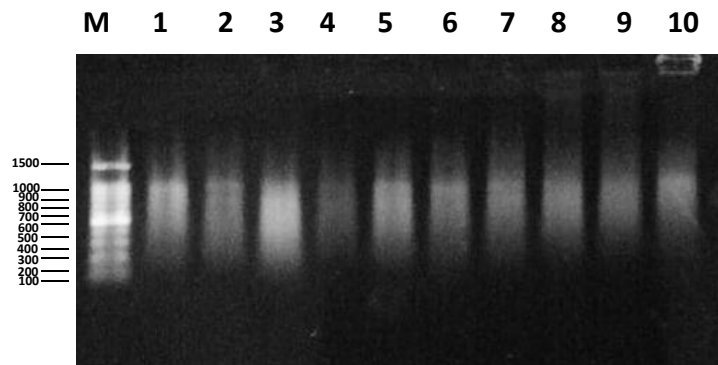




**Figura 29.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X de preparaciones de RNA total de 10 muestras correspondientes a los cultivos A y G. M: marcador de tamaño molecular 1 kb DNA ladder. Carriles 1-5: RNA total de cinco muestras a lo largo del cultivo G. Carriles 6-10: RNA total de cinco muestras a lo largo del cultivo A.



**Figura 30.** Electroforesis digital de preparaciones de RNA total de 10 muestras correspondientes a los cultivos A y G.



**Figura 31.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X de preparaciones de RNA total tratado con DNasa de 10 muestras correspondientes a los cultivos A y G. M: marcador de tamaño molecular 1 kb DNA ladder. Carriles 1-5: RNA total de cinco muestras a lo largo del cultivo G. Carriles 6-10: RNA total de cinco muestras a lo largo del cultivo A.

En la Tabla 32 se muestran los valores obtenidos de concentración y calidad de las muestras de RNA total de los cultivos A y G. Los valores de concentración oscilaron entre 72.0 y 2016.0 ng/μL. Los valores de la relación A260/280 fueron cercanos 2, lo cual indica que hay una muy baja proporción de proteínas respecto al RNA en las muestras. Los valores de RIN oscilaron entre 6.0 y 8.5 en las muestras analizadas.

En la Tabla 33 se muestran la concentración y calidad de las muestras de RNA tratadas con DNAsa. La concentración de las muestras osciló entre 36.8 y 118 ng/μL y la relación A260/280 fue cercana a un valor de 2 en todas las muestras, las cuales son ideales para usarse para la síntesis de DNAc.

**Tabla 32.** Concentración y calidad de las muestras de RNA obtenidas de diferentes tiempos de los cultivos A y G en la etapa de lote alimentado con glicerol, previo al tratamiento con DNAsa.

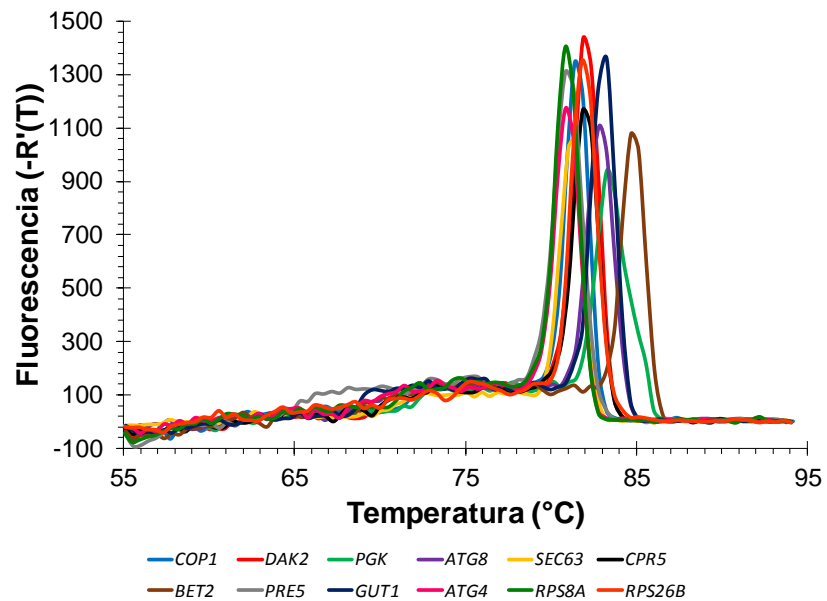
Cultivo G					Cultivo A				
Tiempo (h)	Clave	Concentración (ng/μL)	A260/A280	RIN	Tiempo (h)	Clave	Concentración (ng/μL)	A260/A280	RIN
0.0	1G	1676.0	2.154	8.5	0.0	1A	2016.0	2.172	7.8
9.8	3G	126.0	2.100	6.5	2.6	2A	248.0	2.138	6.0
19.6	4G	1344.0	2.161	6.8	5.2	3A	1340.0	2.175	8.5
24.5	5G	72.0	2.118	6.0	7.8	4A	314.0	2.181	7.1
34.2	7G	610.0	2.148	7.8	10.4	5A	1538	2.166	8.7

**Tabla 33.** Concentración y calidad de las muestras de RNA obtenidas de diferentes tiempos de los cultivos A y G en la etapa de lote alimentado con glicerol, posterior al tratamiento con DNAsa.

Cultivo G				Cultivo A			
Tiempo (h)	Clave	Concentración (ng/μL)	A260/A280	Tiempo (h)	Clave	Concentración (ng/μL)	A260/A280
0.0	1G	96.0	2.087	0.0	1A	84	2.100
9.8	3G	79.6	2.095	2.6	2A	87.6	2.086
19.6	4G	118.0	2.085	5.2	3A	102.0	2.073
24.5	5G	36.8	2.091	7.8	4A	118.0	2.077
34.2	7G	104.0	2.088	10.4	5A	117.0	2.101

### 7.4.3. Ensayos de qPCR para determinar la eficiencia de amplificación y el intervalo de linealidad de los genes seleccionados

Todos los genes analizados mostraron una curva de disociación con un único pico, lo que garantizó la ausencia de la amplificación de productos inespecíficos y la especificidad de los oligonucleótidos diseñados (Figura 32).



**Figura 32.** Curva de disociación para los genes seleccionados expresada como la derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura, donde solo se observa un pico para cada gen utilizando cDNA de la muestra calibradora (tiempo 0 de la etapa de lote alimentado del cultivo G).

Las curvas de amplificación correspondientes a cada gen evaluado obtenidas a partir de diluciones seriadas del cDNA en la muestra de las 0 horas de lote alimentado mostraron un comportamiento similar lo que generó correlaciones de  $C_T$  respecto al logaritmo de la cantidad equivalente de RNA con  $R^2$  mayores a 0.985 y eficiencias de amplificación entre 90.3 y 110.0% (Tabla 34).

**Tabla 34.** Eficiencia, linealidad, intervalos de linealidad de los genes evaluados.

<b>Gen</b>	<b>Eficiencia</b>	<b>Linealidad</b>	<b>Intervalo de linealidad</b>	
			<b>C<sub>T</sub> 1</b>	<b>C<sub>T</sub> 2</b>
<i>FTEII</i>	0.931	0.997	17.82	27.68
<i>GAP</i>	0.903	0.999	18.88	28.90
<i>G6PD</i>	0.969	0.994	21.48	30.98
<i>YPT1</i>	0.935	0.991	23.59	33.68
<i>8A</i>	0.969	0.996	22.80	32.28
<i>26B</i>	0.952	0.997	21.00	30.80
<i>PRE5</i>	0.932	0.999	23.17	33.10
<i>COPI</i>	1.099	0.993	24.26	32.85
<i>DAK2</i>	1.028	0.994	20.03	29.40
<i>GUT1</i>	0.944	0.998	19.75	29.32
<i>KAR2</i>	1.001	0.999	22.80	31.94
<i>PGK</i>	0.981	1.000	20.24	29.61
<i>ATG8</i>	0.981	0.999	22.80	32.22
<i>SSO2</i>	0.901	0.996	24.39	34.51
<i>PMT2</i>	0.934	0.985	25.02	35.29
<i>RSP5</i>	0.911	0.985	25.34	35.21
<i>MPG1</i>	0.922	0.997	24.81	34.59
<i>SEC63</i>	1.100	0.999	25.32	34.08
<i>CPR5</i>	0.925	0.997	23.02	33.03
<i>BET2</i>	0.924	0.997	24.32	34.37
<i>ATG4</i>	1.017	0.996	24.83	33.88

#### **7.4.4. Determinación de los niveles de expresión de los genes seleccionados en los cultivos de alta y baja productividad volumétrica de fitasa extracelular**

Los valores de C<sub>T</sub> obtenidos fueron calculados con un umbral de 2 en el programa LinReg para cada gen, se encontraron dentro del intervalo de linealidad y mostraron valores de CV ≤ 5%, indicando una buena reproducibilidad de los duplicados analíticos en las condiciones de cultivo evaluadas. En las Tabla 35, Tabla 36 y Tabla 37 se muestran la media de los valores C<sub>T</sub>, desviación estándar y coeficientes de variación de cada uno de los genes evaluados en los cultivos A y G. Las curvas de amplificación para cada gen se encuentran en la sección de Anexos.

**Tabla 35.** Valores de ciclo umbral (C<sub>T</sub>) media, y CV (%) de cada uno de los genes evaluados en cuatro muestras correspondientes al cultivo A.

Gen	1A				2A				3A				4A			
	C <sub>T</sub> 1	C <sub>T</sub> 2	Media	C.V. (%)	C <sub>T</sub> 1	C <sub>T</sub> 2	Media	C.V. (%)	C <sub>T</sub> 1	C <sub>T</sub> 2	Media	C.V. (%)	C <sub>T</sub> 1	C <sub>T</sub> 2	Media	C.V. (%)
<i>FTEII</i>	18.67	18.57	18.6	0.27	19.34	19.11	19.2	0.60	18.35	18.86	18.6	1.37	18.97	19.14	19.1	0.45
<i>GAP</i>	22.51	22.48	22.5	0.07	21.33	21.21	21.3	0.28	20.72	20.68	20.7	0.10	21.00	20.97	21.0	0.07
<i>G6PD</i>	23.74	23.79	23.8	0.11	24.31	25.28	24.8	1.96	24.48	24.82	24.7	0.69	24.48	24.82	24.7	0.69
<i>YPT1</i>	26.07	26.01	26.0	0.12	26.87	27.41	27.1	0.99	26.36	26.52	26.4	0.30	26.36	26.52	26.4	0.30
<i>RPS8A</i>	24.17	24.04	24.1	0.26	24.908	24.931	24.9	0.05	24.718	24.617	24.7	0.20	25.103	25.010	25.1	0.19
<i>RPS26B</i>	22.21	22.42	22.3	0.47	21.02	21.02	21.0	0.01	20.45	20.90	20.7	1.10	20.96	21.19	21.1	0.56
<i>PRE5</i>	23.34	22.80	23.1	1.19	23.54	23.02	23.3	1.11	23.15	22.71	22.9	0.96	23.66	23.42	23.5	0.52
<i>COPI</i>	28.39	27.83	28.1	0.98	27.27	27.39	27.3	0.22	26.72	26.89	26.8	0.33	28.31	28.31	28.3	0.00
<i>DAK2</i>	24.92	24.99	25.0	0.13	25.98	26.12	26.0	0.27	25.36	25.64	25.5	0.54	26.04	26.51	26.3	0.90
<i>GUTI</i>	21.47	21.28	21.4	0.46	23.24	22.78	23.0	0.99	21.97	22.30	22.1	0.76	22.76	22.79	22.8	0.06
<i>KAR2</i>	24.64	25.17	24.9	1.05	24.80	25.78	25.3	1.92	24.21	24.25	24.2	0.08	25.61	24.50	25.1	2.21
<i>PGK</i>	22.42	22.28	22.4	0.31	22.33	22.40	22.4	0.14	21.66	21.62	21.6	0.08	22.40	22.39	22.4	0.02
<i>ATG8</i>	26.23	26.31	26.3	0.16	26.12	27.28	26.7	2.17	26.14	26.35	26.2	0.40	26.39	26.74	26.6	0.66
<i>SSO2</i>	25.75	25.40	25.6	0.69	25.67	25.19	25.4	0.93	25.38	24.79	25.1	1.17	25.58	25.73	25.7	0.29
<i>PMT2</i>	29.06	28.63	28.8	0.75	28.43	28.75	28.6	0.57	28.06	28.11	28.1	0.08	29.08	29.11	29.1	0.04
<i>RSP5</i>	30.44	29.57	30.0	1.46	29.93	29.76	29.8	0.28	29.86	29.36	29.6	0.86	31.06	31.02	31.0	0.07
<i>MPG1</i>	28.36	29.23	28.8	1.52	28.31	28.27	28.3	0.09	27.16	27.51	27.3	0.63	27.19	27.04	27.1	0.27
<i>SEC63</i>	26.60	26.09	26.3	0.97	26.47	26.32	26.4	0.29	25.82	25.62	25.7	0.38	26.59	26.33	26.5	0.48
<i>CPR5</i>	24.52	24.52	24.5	0.00	24.88	24.61	24.7	0.54	23.69	23.85	23.8	0.35	24.15	24.45	24.3	0.62
<i>BET2</i>	29.07	28.69	28.9	0.65	28.76	28.64	28.7	0.21	27.38	27.63	27.5	0.46	28.28	28.13	28.2	0.26
<i>ATG4</i>	29.41	29.22	29.3	0.33	30.33	30.16	30.2	0.28	29.50	30.21	29.9	1.19	30.40	30.45	30.4	0.09

**Tabla 36.** Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ) media, y CV (%) de cada uno de los genes evaluados en cuatro muestras correspondientes al cultivo G.

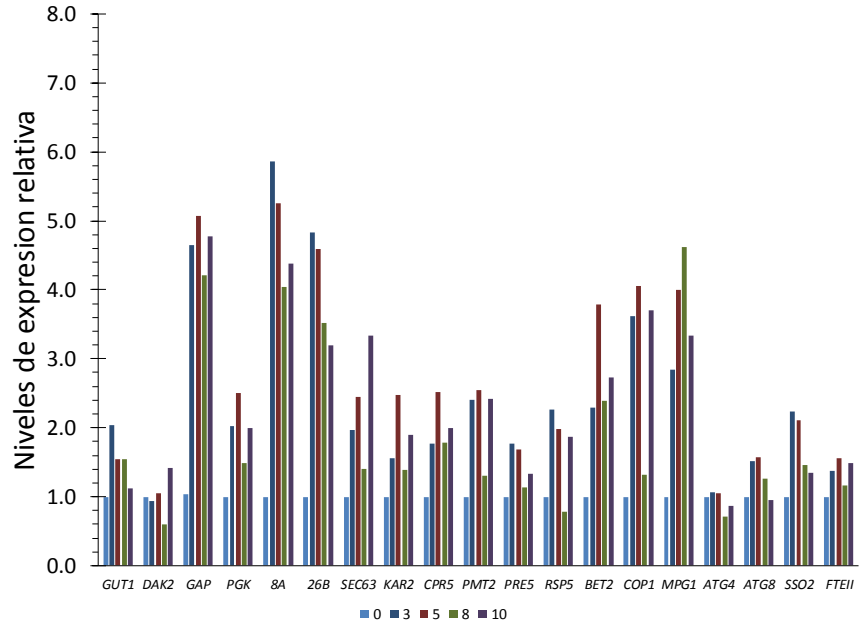
Gen	1G				3G				4G				5G			
	$C_T$ 1	$C_T$ 2	Media	C.V. (%)	$C_T$ 1	$C_T$ 2	Media	C.V. (%)	$C_T$ 1	$C_T$ 2	Media	C.V. (%)	$C_T$ 1	$C_T$ 2	Media	C.V. (%)
<i>FTEII</i>	19.66	19.43	19.5	0.59	22.83	22.92	22.9	0.20	22.00	22.19	22.1	0.43	22.00	21.94	22.0	0.14
<i>GAP</i>	22.51	22.48	22.5	0.07	24.60	24.87	24.7	0.55	24.00	24.12	24.1	0.25	23.67	23.46	23.6	0.45
<i>G6PD</i>	23.93	24.69	24.3	1.56	28.57	28.43	28.5	0.25	27.76	27.39	27.6	0.67	27.26	27.39	27.3	0.24
<i>YPT1</i>	27.12	27.08	27.1	0.07	29.73	30.17	30.0	0.73	28.87	29.03	29.0	0.28	27.89	27.78	27.8	0.20
<i>RPS8A</i>	25.32	25.02	25.2	0.60	26.90	27.06	27.0	0.29	26.39	26.13	26.3	0.49	25.97	25.82	25.9	0.29
<i>RPS26B</i>	23.35	23.45	23.4	0.21	25.94	26.06	26.0	0.23	25.20	25.31	25.3	0.23	24.19	24.26	24.2	0.14
<i>PRE5</i>	25.73	25.83	25.8	0.18	27.68	27.28	27.5	0.74	27.11	26.81	27.0	0.55	25.25	25.77	25.5	1.03
<i>COPI</i>	27.28	26.64	27.0	1.19	29.92	29.80	29.9	0.21	31.53	30.92	31.2	0.98	29.16	29.32	29.2	0.26
<i>DAK2</i>	22.83	22.96	22.9	0.29	27.49	27.92	27.7	0.77	26.61	26.41	26.5	0.37	25.95	26.03	26.0	0.15
<i>GUT1</i>	22.10	22.19	22.1	0.19	26.38	26.16	26.3	0.43	26.25	25.95	26.1	0.58	25.03	24.90	25.0	0.26
<i>KAR2</i>	25.16	24.65	24.9	1.03	26.39	26.60	26.5	0.40	26.18	26.10	26.1	0.16	24.89	25.40	25.1	1.01
<i>PGK</i>	22.56	22.55	22.6	0.02	26.28	26.13	26.2	0.28	25.51	25.45	25.5	0.11	24.75	24.66	24.7	0.19
<i>ATG8</i>	24.91	24.98	24.9	0.15	28.21	28.45	28.3	0.44	28.49	28.51	28.5	0.04	27.60	27.46	27.5	0.25
<i>SSO2</i>	27.43	27.31	27.4	0.22	28.75	28.43	28.6	0.57	27.58	27.44	27.5	0.24	26.92	27.19	27.1	0.50
<i>PMT2</i>	27.70	28.48	28.1	1.39	30.37	30.38	30.4	0.01	31.66	31.68	31.7	0.03	30.20	30.73	30.5	0.86
<i>RSP5</i>	30.82	30.75	30.8	0.11	32.75	32.50	32.6	0.39	31.75	31.74	31.7	0.01	31.11	31.24	31.2	0.21
<i>MPG1</i>	27.49	27.39	27.4	0.18	30.48	30.61	30.5	0.22	30.23	30.17	30.2	0.10	29.00	29.15	29.1	0.25
<i>SEC63</i>	27.46	27.34	27.4	0.23	29.24	30.08	29.7	1.42	29.45	29.52	29.5	0.11	28.41	29.29	28.9	1.53
<i>CPR5</i>	25.22	25.69	25.5	0.94	27.85	28.21	28.0	0.65	27.68	27.54	27.6	0.25	27.05	27.59	27.3	0.98
<i>BET2</i>	29.84	29.00	29.4	1.42	31.87	31.60	31.7	0.43	30.19	30.49	30.3	0.49	30.07	30.31	30.2	0.40
<i>ATG4</i>	28.52	29.35	28.9	1.42	31.66	31.66	31.7	0.01	30.81	31.25	31.0	0.71	30.17	30.78	30.5	1.01

**Tabla 37.** Valores de ciclo umbral ( $C_T$ ) media, y CV (%) de cada uno de los genes evaluados en las muestras correspondientes al tiempo final en el cultivo A y G.

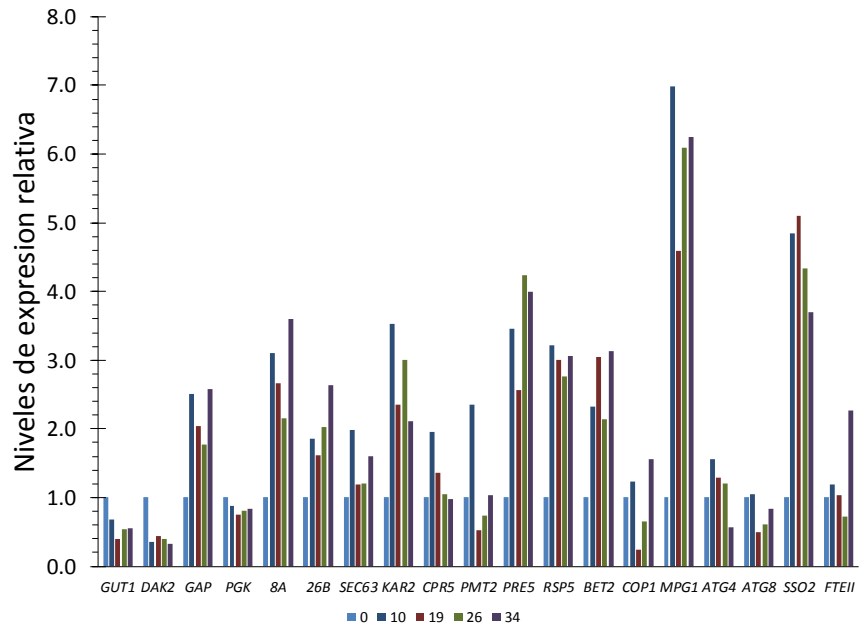
Gen	5A				7G			
	$C_T$ 1	$C_T$ 2	Media	C.V. (%)	$C_T$ 1	$C_T$ 2	Media	C.V. (%)
<i>FTEII</i>	18.23	18.13	18.2	0.28	19.7	19.9	19.8	0.35
<i>GAP</i>	20.29	20.29	20.3	0.00	22.6	22.5	22.6	0.04
<i>G6PD</i>	24.06	24.91	24.5	1.74	26.5	26.5	26.5	0.04
<i>YPT1</i>	25.63	25.63	25.6	0.00	27.9	27.8	27.8	0.20
<i>RPS8A</i>	24.520	24.392	24.5	0.26	24.8	24.7	24.7	0.13
<i>RPS26B</i>	20.87	20.60	20.7	0.66	23.5	23.4	23.4	0.20
<i>PRE5</i>	22.95	22.65	22.8	0.66	25.4	25.0	25.2	0.83
<i>COPI</i>	26.33	26.66	26.5	0.62	27.5	27.8	27.7	0.51
<i>DAK2</i>	24.99	24.25	24.6	1.50	25.7	26.0	25.9	0.61
<i>GUT1</i>	21.87	21.68	21.8	0.44	24.4	24.6	24.5	0.41
<i>KAR2</i>	24.29	24.00	24.1	0.62	24.9	25.6	25.2	1.41
<i>PGK</i>	21.53	21.48	21.5	0.12	24.1	24.4	24.2	0.60
<i>ATG8</i>	26.55	26.46	26.5	0.18	26.7	26.6	26.6	0.17
<i>SSO2</i>	25.34	25.23	25.3	0.21	26.9	26.9	26.9	0.02
<i>PMT2</i>	27.67	27.66	27.7	0.01	29.4	29.6	29.5	0.30
<i>RSP5</i>	29.22	29.19	29.2	0.05	30.5	30.6	30.6	0.24
<i>MPG1</i>	27.19	27.04	27.1	0.27	28.6	28.6	28.6	0.03
<i>SEC63</i>	25.01	24.72	24.9	0.57	28.1	28.1	28.1	0.08
<i>CPR5</i>	23.72	23.56	23.6	0.33	27.0	27.0	27.0	0.05
<i>BET2</i>	27.67	27.35	27.5	0.59	29.1	29.3	29.2	0.37
<i>ATG4</i>	29.36	29.99	29.7	1.06	31.0	31.3	31.2	0.45

En la Figura 33 se muestran los niveles de expresión para el cultivo A a lo largo del tiempo de cultivo en lote alimentado con glicerol. Los niveles de expresión se incrementaron en comparación al tiempo 0, pero se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo de cultivo. Los genes *DAK2*, *FTEII* y *ATG4* prácticamente no presentaron cambios con respecto al tiempo 0.

En la Figura 34, se muestran los niveles de expresión para el cultivo G a lo largo del tiempo de cultivo en lote alimentado con glicerol. Los niveles de expresión se incrementaron en comparación al tiempo 0, pero se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo de cultivo. Los genes *GUT1*, *DAK2*, *PGK*, *PMT2*, *COPI*, *ATG4* y *ATG8* y *FTEII* prácticamente no presentaron cambios con respecto al tiempo 0.



**Figura 33.** Niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo de glicerol, traducción y la ruta de secreción de proteínas en el cultivo A. Valores de expresión relativa obtenidos a diferentes tiempos del cultivo.



**Figura 34.** Niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo de glicerol, traducción y la ruta de secreción de proteínas en el cultivo G. Valores de expresión relativa obtenidos a diferentes tiempos del cultivo.



#### 7.4.5. Comparación de los niveles de expresión de los genes seleccionados con la respuesta fisiológica del hospedero

Los niveles de expresión de los genes *GUT1*, *DAK2*, *GAP* y *PGK* en el cultivo A mostraron diferencias significativas con respecto al cultivo G ( $P \leq 0.05$ ). La ruta del metabolismo del glicerol fue altamente activa en el cultivo A, que tuvo una  $\mu$  de  $0.17 \text{ h}^{-1}$  en comparación con el cultivo G, que tenía una  $\mu$  más baja ( $0.054 \text{ h}^{-1}$ ) (Figura 35).

Los niveles de expresión de *RPS8A* y *RPS26B* también mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) mostrando un comportamiento similar que los genes analizados de la ruta del metabolismo de glicerol (Figura 35).

Los niveles de expresión del gen *SEC63* (involucrado en el proceso de translocación) no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P \geq 0.05$ ) entre las dos condiciones de cultivo (Figura 35).

Los niveles de expresión de los genes *KAR2* y *CPR5* no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P \geq 0.05$ ) entre las dos condiciones de cultivo. Los niveles de expresión alcanzaron valores de 1.8 y 2.7 para *KAR2* y para *CPR5* fue de 2.0 y 1.3 respecto al inicio de la etapa de lote alimentado en el cultivo A y G, respectivamente (Figura 35).

Los niveles de expresión del gen *PMT2* mostraron diferencias significativas con respecto al cultivo G ( $P \leq 0.05$ ). En el cultivo G, se mantuvieron niveles de expresión de 1.0, en comparación con el cultivo A que fueron de 2.2 veces respecto al inicio de la etapa de lote alimentado (Figura 35).

Los niveles de expresión de los genes *PRE5* y *RSP5* mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) siendo más altos en el cultivo G que en A. En el cultivo G, ambos genes mostraron niveles de expresión de 3.6 y 3.0 respectivamente, mientras que en el cultivo A fueron de 1.5 y 1.7, respectivamente (Figura 35).

Los niveles de expresión de *BET2* en los cultivos A y G no mostraron diferencias significativas entre las dos condiciones de cultivo ( $P \geq 0.05$ ). Se mantuvo una expresión relativa de 2.8 veces respecto al inicio de la etapa de lote alimentado (Figura 35).

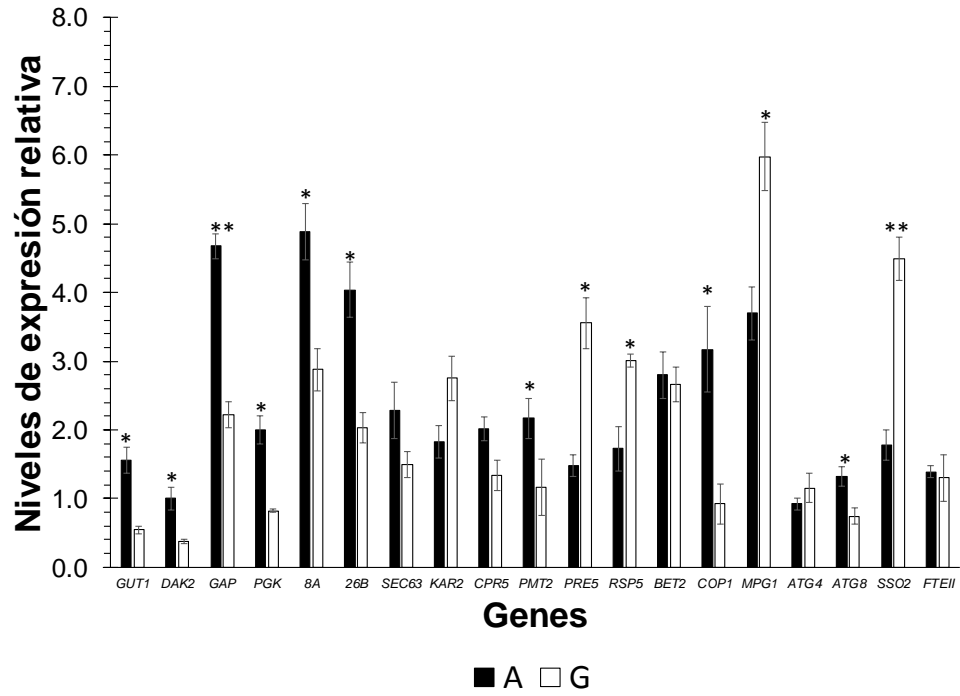
Los niveles de expresión de *COPI* en los dos cultivos mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las dos condiciones de cultivo. En el cultivo A mostró valores de hasta 4 veces respecto al inicio de la etapa de lote alimentado., en comparación con el cultivo G, que no mostró cambios respecto al inicio de la etapa de lote alimentado (Figura 35).

Los niveles de expresión de *MPG1* mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre el cultivo A y G. En ambos cultivos, el gen *MPG1* se activó y los niveles de expresión se mantuvieron constantes durante el tiempo de cultivo alimentado. Los niveles de expresión en el cultivo G fueron mayores en comparación con el cultivo A que fue de 3.7 veces, el cultivo G fue de 6.0 veces respecto al inicio de la etapa de lote alimentado (Figura 35).

Los niveles de expresión de *ATG4* no mostraron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) entre el cultivo A y G. En ambos cultivos, los niveles de expresión no cambiaron respecto al inicio de la etapa de lote alimentado (Figura 35).

Los niveles de expresión de *ATG8* mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre el cultivo A y G. Los niveles de expresión del cultivo A fueron de 1.3 veces respecto al inicio de la etapa de lote alimentado, mientras que los del cultivo G fueron de 0.7 veces respecto al inicio de la etapa de lote alimentado (Figura 35).

Los niveles de expresión de *SSO2* en el cultivo A y G mostraron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre las dos condiciones de cultivo. En el cultivo G, los niveles de expresión fueron de hasta 5.0 y se mantuvieron durante el cultivo. En el cultivo A, los niveles de expresión fueron de 1.8 veces respecto al inicio de la etapa de lote alimentado (Figura 35).



**Figura 35.** Comparación de los niveles de expresión relativa de 19 genes que participan en el metabolismo de glicerol, traducción, translocación, UPR, ERAD, glicosilación, autofagia, exocitosis y el gen heterólogo en los cultivos A y G. \*  $P \leq 0.05$  \*\*  $P \leq 0.01$ .

## 8. DISCUSIÓN

Debido a los riesgos y costos involucrados en el uso de metanol como inductor para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, en la última década se ha ido incrementando el interés por el empleo de promotores alternativos al promotor AOX1 que no requieran metanol (Calik et al., 2015). El promotor GAP es un promotor constitutivo fuerte que no requiere metanol (Looser et al., 2015), por lo que presenta un gran potencial para ser empleado en la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Por tal motivo, en el presente trabajo, se construyeron cepas recombinantes de *P. pastoris* productoras de la fitasa FTEII de forma constitutiva por regulación del gen heterólogo con el promotor *GAP* y se seleccionó una clona sobreproductora de la proteína recombinante. Sólo el 3% de las clonas analizadas se consideraron como sobreproductoras por presentar una concentración de proteínas extracelulares a las 30 h de cultivo mayores al 75% respecto a la cepa que mostró la mayor concentración de proteínas extracelulares. Además, se detectaron clonas que crecieron en ausencia de histidina y no presentaron el gen de interés ni tampoco fue posible la determinación de actividad de fitasa. Este hecho ha sido otorgado a una variación clonal entre las células transformadas. La variación clonal se ha reportado y estudiado previamente en otras cepas de *P. pastoris* (Vogl et al., 2018; Aw et al., 2017, Schwarzhans et al 2016; Viader-Salvadó et al., 2006). En el presente trabajo se empleó la cepa KM71, derivada de la cepa GS115, en la cual la auxotrofia a histidina empleada para la selección de transformantes está dada por una sola mutación en el gen *HIS4*, por lo que existe la posibilidad de que ocurra prototrofia a histidina de manera espontánea (revertantes) y sea una de las principales causas de falsos positivos (Schwarzhans et al., 2016). Se han identificado y descrito diferentes eventos de integración del cassette de expresión que pueden ocurrir en la transformación de *P. pastoris* y que pueden afectar a la producción de proteínas recombinantes y la fisiología celular (Schwarzhans et al 2016b). Esto hace que la selección de la cepa sobreproductora es una de las etapas críticas durante el desarrollo del bioproceso con *P. pastoris*. Para la selección de la cepa sobreproductora, en el presente trabajo se emplearon cultivos en tubo y en matraz agitado en lote seguido de un pulso de alimentación con glicerol. Estos experimentos permitieron la selección de la cepa sobreproductora no solo en los cultivos en tubo agitado (concentración de proteínas extracelulares de 78 mg/L), sino también a

nivel de matraz (concentración de proteínas extracelulares de 234 mg/L). Otras cepas de *P. pastoris* productoras de fitasas generaron concentraciones de proteínas similares a las que se obtuvieron en los experimentos de tubo agitado, pero solo después de un proceso de optimización en los componentes del medio de cultivo y en un volumen de cultivo mayor (Yang *et al.*, 2015). En la literatura se han descrito estrategias a microescala para el análisis del mayor número de clonas transformadas con el fin de seleccionar la clona sobreproductora, por ejemplo, usando placas de 96 pocillos (Looser *et al.*, 2015). Estas estrategias tienen la desventaja que el cultivo no refleja las condiciones que se tienen en los cultivos en lote alimentado en biorreactor y puede conducir a la incorrecta identificación de la cepa sobreproductora. Por lo tanto, la alimentación intermitente o por pulso en placas de pocillos y los matraces agitados no son las opciones más adecuadas para el análisis de clonas. Recientemente, se han desarrollado estrategias basadas en nuevas tecnologías como es el caso de los microbiorreactores para cultivos en lote alimentado empleando dispositivos de microfluidos (Tajsoleiman *et al.*, 2019; Faust *et al.*, 2014). Las desventajas principales de estos dispositivos son la dificultad del suministro continuo de alimentación y que no se pueden emplear para llevar a cabo cultivos a altas densidades celulares. Pese a ello, se han realizado esfuerzos para desarrollar estrategias y dispositivos que permitan sobrepasar las desventajas mencionadas previamente. También se han descrito cultivos en microbiorreactores con cepas de *P. pastoris* que regulan el gen heterólogo con el promotor *AOX1* empleando metanol gaseoso en el medio de cultivo o combinaciones de glicerol-metanol (Schneider *et al.*, 2016; Hemmerich *et al.*, 2014), y con cepas que regulan el gen heterólogo con el promotor *GAP* empleando glicerol (Eck *et al.*, 2018).

En el presente trabajo, se empleó el método de optimización Simplex para incrementar la productividad volumétrica extracelular de la fitasa FTEII, optimizando la concentración inicial de glicerol, y el pH, temperatura y velocidad específica de crecimiento en la etapa de lote alimentado con glicerol. La velocidad específica de crecimiento en la etapa de lote alimentado se pudo controlar gracias al empleo de una velocidad de alimentación de glicerol que fue cambiando según una función exponencial, tal como se ha recomendado en la literatura (Looser *et al.*, 2015). Las velocidades específicas experimentales sólo difirieron en un 6% en promedio (1-14%) respecto a los

valores teóricos deseados. El método de optimización Simplex condujo a una producción, producción volumétrica y productividad de fitasa extracelular de 91,787 U, 19,945 U/L de medio de cultivo y 384 U/L h, respectivamente, en un cultivo de 57 horas totales con 34 horas de lote alimentado (cultivo G), lo cual corresponde a valores de 5, 4 y 2 veces mayores respecto al cultivo de menor producción, producción volumétrica y productividad de fitasa extracelular (cultivo A). De forma similar, nuestro equipo de trabajo optimizó mediante el método Simplex cinco factores ambientales que definen las condiciones de cultivo para incrementar la producción extracelular de la fitasa FTEII regulada por el promotor AOX1 en una cepa de *P. pastoris* Mut<sup>s</sup>. La producción de fitasa extracelular en el cultivo optimizado de esta cepa fue 11 veces mayor comparada con la del cultivo de menor producción. Para optimizar condiciones de cultivo e incrementar la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, otros autores han realizado experimentos empleando el enfoque tradicional de un factor a la vez (Azadi *et al.*, 2018; Azadi *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2014), lo cual suele ser un método ineficiente porque no evalúa posibles interacciones entre dos o más factores, aunado a que es un método muy laborioso. Desde que se aisló la secuencia del promotor GAP en 1997, se han realizado estudios empleando este promotor para la producción de diferentes proteínas recombinantes (Zhu *et al.*, 2014; Guan *et al.*, 2013; García-Ortega *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2012; Fei *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2008; Menendez *et al.*, 2004; Waterham *et al.*, 1997). Simultáneamente se han empleado diferentes estrategias para incrementar la producción de proteínas regulada por el promotor GAP en cepas de *P. pastoris*, entre las cuales se encuentra la optimización de la composición del medio de cultivo (Mao *et al.*, 2015), optimización de la velocidad de alimentación de la fuente de carbono y la tensión de oxígeno disuelto empleando un método de superficie de respuesta (Anane *et al.*, 2016), combinación de fuentes de carbono (glucosa y glicerol) durante las etapas de lote y lote alimentado (García-Ortega *et al.*, 2013), y combinación de una alta velocidad específica de crecimiento con intervalos sin alimentación (García-Ortega *et al.*, 2016).

En el presente trabajo también se determinó la respuesta fisiológica del hospedero durante el proceso de optimización. A pesar de la reciente popularidad del empleo del promotor GAP, sólo unos pocos trabajos exploran la respuesta fisiológica del hospedero

durante la producción de proteínas recombinantes (n *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019; Looser *et al.*, 2017; Rebnegger *et al.*, 2014). Generalmente las características fisiológicas de las cepas productoras se estudian en cultivos continuos debido a que proporciona condiciones de cultivo muy estables en estado estacionario. Los cultivos en lote alimentado también se han empleado para obtener información relacionada con el estado fisiológico de cepas productoras (García-Ortega *et al.*, 2019). El empleo de un perfil exponencial de la velocidad de alimentación permite mantener una  $\mu$  constante (Looser *et al.*, 2015), lo cual proporciona una estrategia eficaz para alcanzar condiciones de estado pseudo-estacionario a lo largo de la etapa de lote alimentado (García-Ortega *et al.*, 2016; García-Ortega *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2000). Debido a que en el presente trabajo se empleó esta estrategia de adición de glicerol, en todos los cultivos se alcanzó un estado pseudo-estacionario durante la etapa de lote alimentado.

Durante el proceso de optimización, el pH y la densidad celular (controlada con la concentración inicial de glicerol en la etapa de lote) al inicio de la etapa de lote alimentado no mostraron un efecto evidente en la producción de fitasa extracelular. El uso de una menor densidad celular al inicio de la etapa de lote alimentado podría incrementar la producción de fitasa durante la etapa de lote alimentado al incrementar el tiempo para crecer en fase exponencial y así producir más fitasa al término del cultivo. Sin embargo, la producción de fitasa extracelular no fue afectada por la densidad celular al inicio de la etapa de lote alimentado, pero sí tuvo un efecto en la duración del cultivo y por lo tanto en la productividad volumétrica extracelular de fitasa, que condujo a la reducción de 8 horas de cultivo (cultivos F y G). La mayoría de los cultivos realizados con *P. pastoris* reportados en la literatura emplean 40 g/L de glicerol (o glucosa) en la etapa de lote (Wang *et al.*, 2017; Mao *et al.*, 2015; García-Ortega *et al.*, 2013; Goodrick *et al.*, 2001).

El pH afectó el comportamiento del cultivo durante algunos de los experimentos realizados debido a la formación de espuma en los cultivos a pH 4 (cultivos B y D), aunque durante el proceso de optimización, el pH en la etapa de lote alimentado fue oscilando entre dos valores (pH 4 y 6). Sin embargo, en cepas de *P. pastoris* productoras de la fitasa FTEII a través del promotor *AOX1*, el pH en la etapa de inducción con metanol mostró un efecto directamente proporcional en la producción de fitasa extracelular hasta un pH de 6.0 (Viader-Salvadó *et al.*, 2013).

La temperatura en la etapa de lote alimentado mostró un efecto inversamente proporcional en la producción de fitasa extracelular. Esta relación inversamente proporcional de la temperatura con la producción extracelular de fitasa está en concordancia con resultados previos de nuestro grupo de trabajo (Viader-Salvadó *et al.*, 2013), donde se encontró que la temperatura en la etapa de inducción con metanol en cepas productoras de la fitasa FTEII a través del promotor AOX1 también presentó un efecto inversamente proporcional con la producción de fitasa debido a un incremento en la actividad metabólica de *P. pastoris* y en la eficiencia del proceso de secreción y a una disminución en la actividad extracelular de proteasas probablemente debido a una menor lisis celular. También se ha demostrado que emplear temperaturas menores de 30°C en cultivos con *P. pastoris* disminuye la degradación de proteínas (Tang *et al.*, 2019), reduce la muerte celular (Gasser *et al.*, 2008, Jahic *et al.*, 2003) y afecta la porosidad de la membrana celular (Aguilar-Uscanga & François 2003). En el cultivo A (30°C) la actividad volumétrica de fitasa extracelular disminuyó al final del cultivo, pero la concentración de proteínas extracelulares no lo hizo, indicando que podría estar ocurriendo lisis celular. Algunos de los experimentos sugeridos por el método Simplex indicaban el uso de temperaturas menores a 24°C, sin embargo, no pudieron llevarse a cabo por las limitaciones del equipo empleado y las altas densidades celulares alcanzadas durante la etapa de lote alimentado.

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) también mostró un efecto inversamente proporcional en la producción y productividad de fitasa extracelular. Los cultivos realizados con las  $\mu$  más bajas (0.054 h<sup>-1</sup>) mostraron tener la producción, productividad volumétrica y  $Y_{p/x}$  más altos. Sin embargo, a excepción del cultivo B, la productividad específica ( $q_p$ ) se mantuvo prácticamente constante a un valor de 8 U g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a pesar de que la  $\mu$  fue disminuyendo durante el proceso de optimación de 0.176 a 0.054 h<sup>-1</sup>. Estos resultados difieren de lo que está reportado para cepas productoras de proteínas recombinantes empleando el promotor *GAP* (Looser *et al.*, 2017; Looser *et al.*, 2015; Rebnegger *et al.*, 2014; García-Ortega *et al.*, 2013), en donde se describe un aumento de  $q_p$  al aumentar la  $\mu$  hasta valores cercanos a la  $\mu_{max}$ . La mayoría de los reportes relacionados a cultivos empleando cepas productoras reguladas por el promotor *GAP*, indican que la  $q_p$ , la producción de proteína y el  $Y_{p/x}$  son mayores cuando se emplean



valores de  $\mu$  cercanos a la  $\mu_{\max}$  (García-Ortega *et al.*, 2019; Looser *et al.*, 2015; Rebnegger *et al.*, 2014; García-Ortega *et al.*, 2013; Khasa *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 2006). También se ha encontrado que controlando la  $\mu$  para que disminuya a lo largo de la etapa de lote alimentado conduce a mayores productividades y producción de proteína (Buchetics *et al.*, 2011, Maurer *et al.*, 2006, de Hollander 1993), por lo que posiblemente buscar valores altos de  $q_p$  a una  $\mu$  cercanos a la  $\mu_{\max}$  no siempre sea lo más adecuado durante la optimización de un bioproceso con cepas que regulan la expresión del gen heterólogo a través del promotor *GAP*.

En el desarrollo de un bioproceso, la maximización de la productividad volumétrica, y de los rendimientos  $Y_{p/x}$  y  $Y_{p/s}$  es un aspecto clave para disminuir costos, siendo el objetivo maximizar estos parámetros antes de que el sistema alcance sus limitaciones y se presenten restricciones biológicas y físicas. Durante el proceso de optimización, los dos rendimientos relacionados con el producto recombinante ( $Y_{p/x}$  y  $Y_{p/s}$ ) fueron aumentando, lo que demuestra la efectividad del método de optimización empleado para maximizar parámetros fisiológicos relacionados con la producción del producto recombinante. El aumento de estos dos rendimientos estuvo relacionado fundamentalmente a la disminución de la temperatura y la velocidad específica de crecimiento. Sin embargo, el  $Y_{x/s}$  se estabilizó a un valor (0.44 g/g) un poco menor al máximo alcanzado durante el proceso de optimización y menor al valor reportado en la literatura (García-Ortega *et al.*, 2013), lo que indica que en las condiciones óptimas es posible que el glicerol no se esté metabolizando totalmente y se esté acumulando, como ya se ha visto en algunos cultivos con *E. coli* (Reichelt *et al.*, 2017), o bien que aumenta la proporción de glicerol que se emplea para generación de energía respecto a la generación de biomasa, en relación con otros cultivos del proceso de optimización. Se ha visto que en cultivos a valores bajos de  $\mu$ , la energía de mantenimiento requerida es mayor (Rebnegger *et al.*, 2014).

Con el fin de comprender mejor el impacto de las condiciones de cultivo en la fisiología de la cepa construida en el presente trabajo, se analizó la expresión de genes representativos de la ruta de secreción, del metabolismo del glicerol y genes relacionados con el proceso de traducción, junto con el gen heterólogo (*FTEII*) en los cultivos A y G (baja productividad volumétrica de fitasa extracelular y alta  $\mu$ ; alta productividad

volumétrica de fitasa extracelular y baja  $\mu$ ). Para una mejor determinación de los niveles de expresión de los genes analizados, se emplearon dos genes normalizadores (*G6PD* y *YPT1*) lo cual minimiza errores de cálculo debido a pequeñas variaciones de los niveles de expresión de estos dos genes constitutivos. Adicionalmente, se empleó como muestra calibradora el inicio de la etapa de lote alimentado con glicerol, por lo que los niveles de expresión se reportan como niveles de expresión relativa al inicio de la etapa de lote alimentado.

Los niveles de expresión del gen heterólogo *FTEII* regulado por  $P_{GAP}$  fue de 1.4 en promedio, permaneciendo prácticamente constantes durante la etapa de lote alimentado, y no mostraron diferencias significativas entre los dos cultivos, lo que indica que la diferencia en la producción de fitasa extracelular no estuvo relacionada con la transcripción del gen *FTEII*. En contraste, los niveles de expresión del gen *GAP* fueron de 4.7 y 2.2 en los dos cultivos A y G, respectivamente, lo cual son valores 3.4 y 1.6 veces mayores que los niveles de expresión del gen *FTEII*, a pesar que ambos genes (*GAP* y *FTEII*) están regulados por el mismo promotor ( $P_{GAP}$ ). Este fenómeno podría ser debido a una diferencia en otros elementos que regulan la expresión de estos genes, ya sea en *cis*, como el terminador de la transcripción, o en *trans* debido a la diferencia en la posición en el genoma en la que se encuentran los dos genes (*GAP* en el cromosoma 2 y *FTEII* en el cromosoma 1 donde se encuentra el gen *HIS4*).

En el cultivo A (alto valor de  $\mu$ ), los genes implicados en el metabolismo de glicerol (*GUT1*, *DAK2*, *GAP*, *PGK*) mostraron niveles de expresión de 1.0 a 4.7 veces respecto al inicio de la etapa de lote alimentado y estuvieron sobreexpresados respecto al cultivo G (bajo valor de  $\mu$ ), lo cual está en concordancia con lo reportado previamente (Rebnegger *et al.*, 2014), en donde se correlacionó la expresión de los genes del metabolismo del glicerol de forma directamente proporcional con la velocidad específica de crecimiento. Este comportamiento también se observó en la expresión de los genes relacionados con la traducción (*RPS8A* y *RPS26B*) en los dos cultivos. En *S. cerevisiae* se ha reportado que cuando se incrementa la  $\mu$ , aumenta la fracción de fuente de carbono que se dirige a la generación energía y a la maquinaria de síntesis (Pejin y Razmovski, 1993).

El proceso de translocación a la membrana del retículo endoplásmico (gen *SEC63*) estuvo activo en los dos cultivos, pero no se observaron diferencias significativas entre ellos.

Respecto a genes involucrados en el plegamiento de proteínas, los dos cultivos mostraron niveles de expresión relativos del gen *KAR2* que codifica para la chaperona BiP de 1.7 a 2.8 veces, indicando una actividad de UPR en los dos cultivos. Aunque se ha reportado que las chaperonas involucradas en el plegamiento y la respuesta UPR se sobreexpresan en cultivos que tienen una  $\mu$  cercana a la  $\mu_{\max}$  ( $0.15 \text{ h}^{-1}$ ) (Rebnegger *et al.*, 2014), en nuestro caso, la media de los niveles de expresión del gen *KAR2* fue menor en el cultivo A que en el cultivo G. Altos niveles de BiP facilitarían el correcto plegamiento de FTEII y su posterior secreción. El gen *CPR5* que codifica para la foldasa peptidil-prolil cis-trans isomerasa fue al revés, aunque la expresión de estos genes no mostraron diferencias significativas entre los dos cultivos. El contenido de prolinas en la secuencia de FTEII es del 4.5% lo cual es un valor un poco menor al promedio reportado (5.2%) para 1,150 proteínas (Doolittle 1985), por lo que probablemente el correcto plegamiento de FTEII no está altamente relacionado con la peptidil-prolil cis-trans isomerasa.

El gen *PMT2* involucrado en la O-glicosilación en el retículo endoplásmico y en los fenómenos de UPR y ERAD (Xu y Ng, 2015; Goder y Melero, 2011), estuvo sobreexpresado en el cultivo A respecto al cultivo G. FTEII no está O-glicosilada, por lo que probablemente en este caso la expresión de *PMT2* sea un marcador de ERAD, lo que indicaría una probable degradación mayor de FTEII en el cultivo A que en cultivo G por esta vía. Esto está correlacionado con la menor expresión del gen *KAR2* en el cultivo A, lo cual generaría una mayor proporción de proteína mal legada y la activación del mecanismo de ERAD a través del proceso de control de calidad del retículo endoplásmico. Sin embargo, el mecanismo de degradación proteica en el proteosoma por ubiquitinación parece que estuvo más activo en el cultivo G que en el cultivo A, ya que los genes *PRE5* y *RSP5* estuvieron sobreexpresados en el cultivo G. En trabajos previos de nuestro grupo de trabajo se observó este fenómeno en cepas de *P. pastoris* de una proteína recombinante regulada por el promotor AOX1 en condiciones de sobreproducción (Corro- Mendivil, 2017), lo cual pudiera indicar que este mecanismo de degradación no

afecta sustancialmente a la proteína recombinante, sino que es un mecanismo recambio de proteico que ayuda a la síntesis de otras proteínas.

El gen *BET2* implicado en el tráfico vesicular COPII del retículo endoplásmico al aparato de Golgi mostró una expresión relativa de 2.8 veces respecto al inicio de la etapa de lote alimentado, pero no se observaron diferencias significativas entre los dos cultivos, lo que indica que este proceso estuvo activo en los dos cultivos. Sin embargo, el proceso de tráfico vesicular COPI del aparato de Golgi al retículo endoplásmico (gen *COPI*) estuvo mucho más activo en el cultivo A que en el cultivo G. El gen *COPI* está involucrado en el mecanismo de control de calidad del retículo endoplásmico que asegura el ensamblaje correcto de ciertas proteínas y en la recuperación/retención de proteínas en el retículo endoplásmico. La sobreexpresión del gen *COPI* en el cultivo A podría indicar que una gran parte de la proteína recombinante es devuelta al retículo endoplásmico debido al plegamiento incorrecto de la proteína o por alguna otra razón (Beck et al., 2009) y es enviada a degradación por el mecanismo ERAD.

El gen *MPGI* que codifica para la mannososa-1-fosfato guaniltransferasa, la cual participa en la transferencia de manosas en la última etapa de la glicosilación en el aparato de Golgi, se encontró activo en ambos cultivos ya que los niveles de expresión de *MPGI* fueron de 3.7 a 6 veces respecto al inicio de la etapa de lote alimentado, lo cual favorece al proceso de glicosilación, ya que la fitasa FTEII tiene cuatro sitios de N-glicosilación (Viader-Salvadó et al., 2010). Pero que el gen *MPGI* estuvo sobreexpresado en el cultivo G en comparación con el cultivo A indica que probablemente más moléculas de proteína recombinante llegaron al aparato de Golgi en el cultivo G que en el A para completar su N-glicosilación. Además, este gen participa en la biosíntesis de la pared celular y la integridad celular (Jiang et al., 2008; Davis et al., 2004), por lo que es posible que tenga un rol importante para evitar la lisis celular.

La expresión del gen *ATG4* relacionado con la autofagia, prácticamente no aumentó respecto al inicio de la etapa de lote alimentado y no se observaron diferencias significativas entre los dos cultivos. El gen *ATG8* también relacionado con autofagia y en la dinámica de la membrana vacuolar sólo mostró una expresión relativa de 1.3 veces en el cultivo A respecto al inicio de la etapa de lote alimentado, pero su expresión relativa

fue mayor que en el cultivo G. La proteína ATG4 participa en una activación proteolítica de la proteína ATG8, sin embargo, también se ha reportado que ATG8 se asocia con las vacuolas y participa en la autofagia sin necesidad de activarse (Tamura et al., 2010), lo cual justificaría que la expresión del gen *ATG4* no mostrara diferencias significativas entre los dos cultivos, mientras que la expresión del gen *ATG8* sí sea diferente entre los dos cultivos.

El gen *SSO2*, involucrado en la exocitosis, mostró una expresión relativa de 4.5 veces en el cultivo G con una gran diferencia con el cultivo A, lo que podría indicar que la exocitosis se ve favorecida en cultivos con  $\mu$  más baja. En la literatura ya se ha reportado que los genes relacionados en la exocitosis están subexpresados a  $\mu$  cercanas a la  $\mu_{\max}$ , lo que indica un posible cuello de botella para la secreción de proteínas recombinantes (Rebnegger et al., 2014). Existen reportes de que la sobreexpresión de *SSO2* mejora la secreción de proteínas en varios casos (Jiao et al., 2018; Sun et al., 2017), aunque también se ha reportado que no afecta significativamente al proceso de secreción (Gasser et al., 2007).

En el presente trabajo, los niveles de producción y productividad extracelular de fitasa que se obtuvieron con la cepa KM71GAHFTEII, no superaron a los obtenidos por la cepa KM71FTEII (Viader-Salvadó et al., 2013). La cepa KM71FTEII mostró una productividad volumétrica 2 veces mayor que la obtenida por KM71GAHFTEII en este trabajo. Además, los niveles de producción de fitasa extracelular y el  $Y_{p/x}$  fueron 6 y 5 veces mayores, respectivamente, en la cepa KM71FTEII. Por lo tanto, todavía es necesario mejorar el sistema de expresión mediado por el promotor *GAP* para que alcance al tradicional sistema de expresión mediado por el promotor *AOX1*. Una posibilidad está relacionada con que el casete de expresión utilizado en la construcción de la cepa KM71GAHFTEII contiene el promotor *GAP* (incluida la región 5'UTR) y el terminador del gen *AOX1* (incluida la región 3'UTR de *AOX1*). Estas regiones juegan un papel importante en la regulación de la expresión de genes (Tuller et al., 2009). Debido a la naturaleza híbrida de los elementos reguladores contenidos en el casete de expresión, es posible que tenga un efecto negativo sobre la estabilidad del mRNA y que eso pudiera explicar la menor producción y rendimiento  $Y_{p/x}$  de la fitasa FTEII en la cepa KM71GAHFTEII que en la cepa KM71FTEII. Hasta el momento no hay estudios al

respecto. Se necesitan más estudios para comprender mejor la regulación de estos elementos en cepas productoras de proteínas reguladas por *GAP*.

El presente trabajo no solo trata de la construcción y selección de una cepa sobreproductora de *P. pastoris* regulada por el promotor *GAP* y la optimización de las condiciones de cultivo, sino que también contribuye al entendimiento del impacto de las condiciones de cultivo en la respuesta fisiológica del huésped. Los resultados obtenidos indican que dos de los factores que constituyeron las condiciones de cultivo, la velocidad específica de crecimiento y la temperatura, tuvieron un efecto inversamente proporcional sobre la productividad volumétrica de fitasa extracelular y los dos rendimientos  $Y_{p/x}$  y  $Y_{p/s}$ , mientras que el pH y la concentración inicial de glicerol no tuvieron un efecto significativo sobre estos parámetros. Además, los resultados obtenidos sugieren que la producción y productividad de fitasa extracelular no se vio afectada por la transcripción ni la traducción del gen *FTEII* durante el proceso de optimización, sino que la optimización de las condiciones de cultivo conduce a un proceso de secreción mejorado. En los cultivos con  $\mu$  cercanos a la  $\mu_{max}$  y temperatura más alta (30°C), las moléculas de proteína recombinante sintetizadas llegan al retículo endoplásmico donde probablemente no se pueden plegar por completo, lo que activa la respuesta UPR, pero debido a la saturación del sistema derivado de la generación de biomasa, la proteína recombinante sobrepasa el control de calidad del retículo endoplásmico sin importar su estado de plegamiento, pasando por el sistema de tráfico de vesículas para dirigirse al aparato de Golgi. En este punto, probablemente, la proteína es devuelta al retículo endoplásmico por el sistema COPI y es enviada a degradación por el mecanismo ERAD. La fracción de moléculas de proteína plegadas correctamente continúa en la ruta de secreción. En contrapartida, en el cultivo G (menor velocidad específica y temperatura) las moléculas de proteína recombinante sintetizadas llegan al retículo endoplásmico donde probablemente el plegamiento es más eficiente que en el cultivo A, lo que les permite pasar por el sistema de tráfico de vesículas para dirigirse al aparato de Golgi y que sólo una pequeña fracción se regrese al retículo endoplásmico quedando la mayor parte de la proteína recombinante en la ruta de secreción con glicosilación (manosilación) en el aparato de Golgi y secreción final por exocitosis, todo esto apoyado por el mecanismo de recambio de proteico activado que ayuda a la síntesis de la proteína recombinante.

## 9. CONCLUSIONES

- Se construyó y seleccionó una cepa de *P. pastoris* KM71GAHFTEII sobreproductora de la fitasa FTEII regulada por el promotor constitutivo *GAP*.
- Con el método de optimización simplex se logró determinar las condiciones (cultivo G) que permiten producir hasta 91,787 U (19,945 U/L, 1.0 g/L) valores que son 5 veces más altos que los obtenidos por el cultivo de menor producción (cultivo A). A pesar de los niveles de producción y productividad extracelular de fitasa que se obtuvieron con la cepa KM71GAHFTEII, no superaron a los obtenidos por la cepa KM71FTEII.
- Dos de los factores que constituyeron las condiciones de cultivo, la velocidad específica de crecimiento y la temperatura, tuvieron un efecto inversamente proporcional sobre la productividad volumétrica de fitasa extracelular y los dos rendimientos  $Y_{p/x}$  y  $Y_{p/s}$ , mientras que el pH y la concentración inicial de glicerol no tuvieron un efecto significativo sobre estos parámetros.
- El incremento en los rendimientos  $Y_{p/x}$  y  $Y_{p/s}$  demuestra la efectividad del método de optimización empleado para maximizar parámetros fisiológicos relacionados con la producción del producto recombinante.
- La producción de fitasa extracelular no estuvo relacionada con la transcripción del gen *FTEII*, lo que indica que la diferencia en los niveles de producción se debe a que la optimización de las condiciones de cultivo conduce a un proceso de secreción mejorado.

## 10.PERSPECTIVAS

A partir del presente trabajo surgieron nuevas hipótesis que podrían contribuir al progreso en este campo de estudio, como, por ejemplo, mejorar el sistema de expresión del promotor GAP. Una de las posibilidades de mejora está en el diseño del casete de expresión, debido a la naturaleza híbrida de los elementos reguladores contenidos en el casete de expresión es posible que tenga un efecto negativo en la estabilidad del mRNA y que sea una posible causa de por qué la producción sea menor en la cepa KM71GAHFTEII.

Otra hipótesis que surgió durante la realización del presente trabajo fue el empleo de condiciones de baja concentración de oxígeno disuelto. Se han reportado cultivos de cepas de *P. pastoris* reguladas por el promotor GAP que en condiciones de hipoxia incrementan la producción de la proteína recombinante. En el grupo de trabajo se realizó un cultivo en condiciones de hipoxia y mostró resultados prometedores al incrementarse el  $Y_{p/x}$  considerablemente, ya que se observó la generación de poca biomasa con respecto a la proteína producida, pero hacen falta más experimentos que comprueben dicha hipótesis.

Otro punto a considerar en trabajos posteriores es evaluar el efecto en la expresión del gen heterólogo del sitio de integración del casete de expresión en el genoma de la levadura, ya que pudieran verse afectados funcionalmente elementos reguladores en trans.



## APÉNDICES

### APÉNDICE A

#### CUANTIFICACIÓN RELATIVA

Para realizar el cálculo de los niveles de expresión relativos se empleó el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrito en trabajos previos (Félix-Castro, 2013). Donde se calcula la cantidad de blanco normalizado a un control endógeno y relativo a un calibrador con una corrección a la fórmula original (Pfaffl., 2004) para incluir en el cálculo los valores de las eficiencias de amplificación obtenidas para cada gen y factores de dilución de los DNAs empleados en los ensayos de qPCR (si los hubiere):

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

**Ecuación 8.** Cálculo de la expresión relativa incluyendo eficiencias de amplificación y factores de dilución.

Donde:

$X_{N,q}$  = Cantidad normalizada de moléculas blanco en cualquier muestra

$X_{N,cb}$  = Cantidad normalizada de moléculas blanco en la muestra calibradora

$C_{T,X,q}$  = ciclo umbral de la amplificación de las moléculas blanco en cualquier muestra

$C_{T,X,cb}$  = ciclo umbral de la amplificación de las moléculas blanco en la muestra calibradora

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

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

$E_X$  = eficiencia de la amplificación de las moléculas de blanco

$E_R$  = eficiencia de la amplificación de las moléculas de referencia

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

$FD_{X,cb}$  = Factor de dilución de las moléculas blanco en cualquier muestra

$FD_{R,q}$  = Factor de dilución de la molécula de referencia en la muestra calibradora

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

## APÉNDICE B

### Curvas de amplificación de las muestras de los cultivos A y G

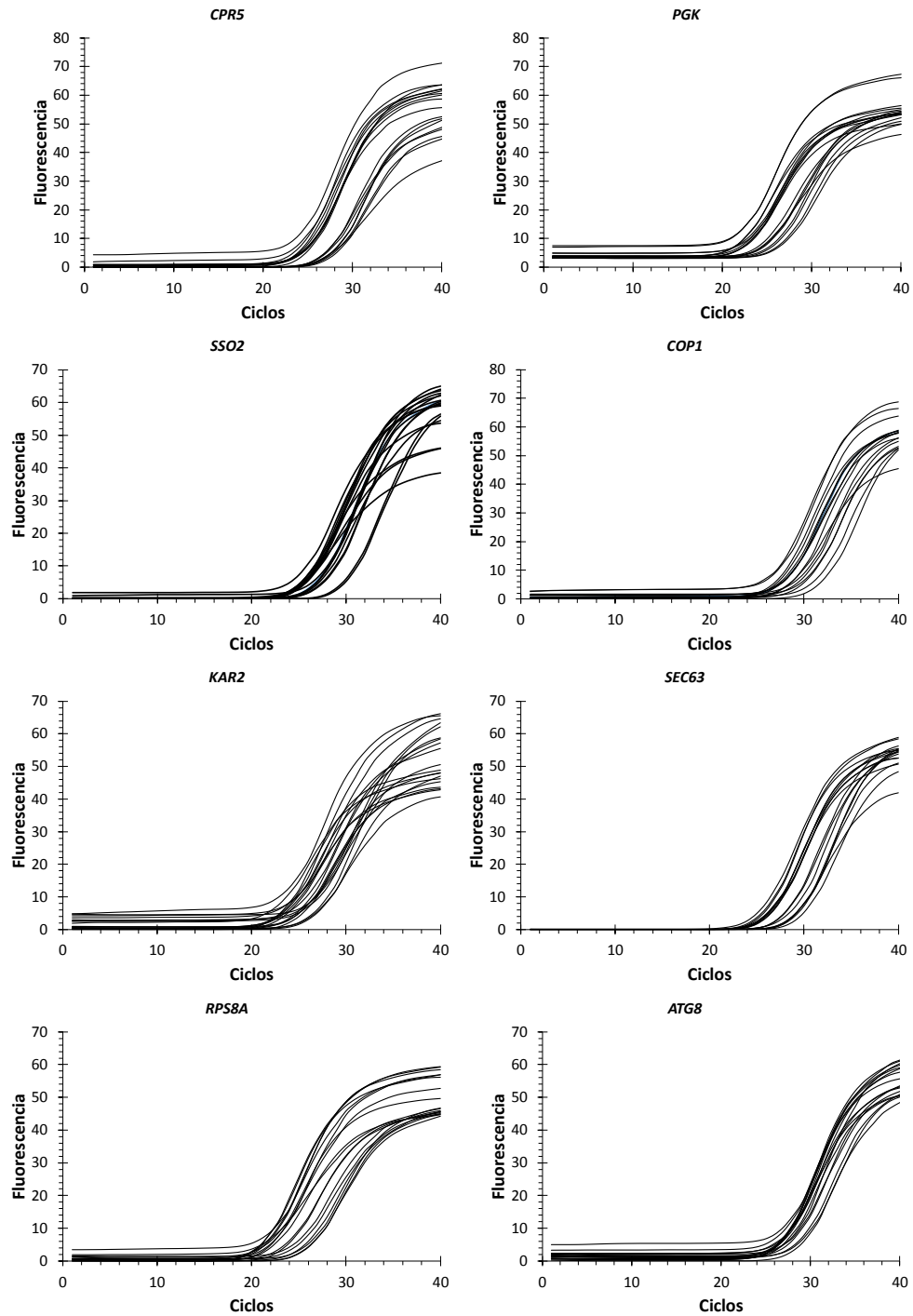
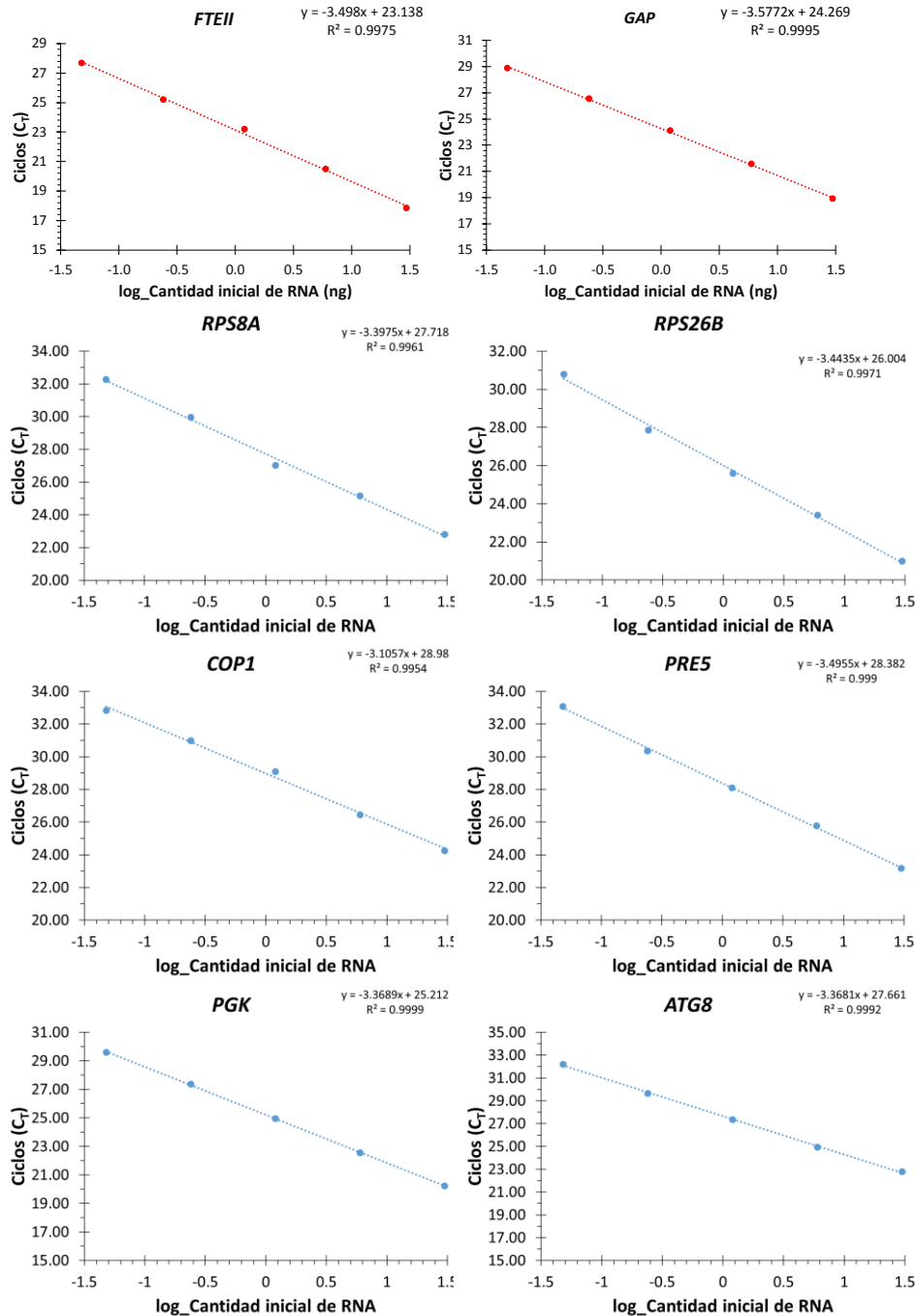


Figura 36. Curvas de amplificación de los cultivos A y G. Sólo se muestran de algunos genes.

# APÉNDICE C

## Rectas de calibración



**Figura 37.** Correlación de los valores del ciclo umbral (Ct) respecto al logaritmo de la cantidad equivalente de RNA, obtenida a partir de las curvas de amplificación de los genes generadas a partir de diluciones seriadas del cDNA correspondiente al tiempo 0. Solo se muestran algunos genes

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Applied Microbiology and Biotechnology 98(12), 5301–5317
2. Anane E, van Rensburg E, Görgens JF. 2016. Comparison of constitutive and inducible  $\beta$ -fructofuranosidase production by recombinant *Pichia pastoris* in fed-batch culture using defined and semi-defined media. South African Journal of Chemical Engineering 22:17–22.
3. Aw R, Barton GR, Leak DJ. 2017. Insights into the prevalence and underlying causes of clonal variation through transcriptomic analysis in *Pichia pastoris*. Applied Microbiology and Biotechnology 2017;101(12):5045–58.
4. Azadi S, Mahboubi A, Naghdi N, Solaimanian R, Mortazavi SA. 2017. Evaluation of Sorbitol-Methanol Co-Feeding Strategy on Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Pichia pastoris*. Iranian journal of pharmaceutical research 16(4):1555–64.
5. Azadi S, Sadjady SK, Mortazavi SA, Naghdi N, Mahboubi A, Solaimanian R. 2018. Bioprocess and downstream optimization of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. Research in pharmaceutical sciences 13(3):222–38.
6. Barrigon JM, Valero F, Montesinos JL. 2015. A macrokinetic model-based comparative meta-analysis of recombinant protein production by *Pichia pastoris* under AOX1 promoter. Biotechnology and Bioengineering 112:1132–45.
7. 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).
8. Berrios J, Flores MO, Díaz-Barrera A, Altamirano C, Martínez I, Cabrera Z. 2017. A comparative study of glycerol and sorbitol as co-substrates in methanol-induced cultures of *Pichia pastoris*: temperature effect and scale-up simulation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 44(3):407–11.
9. Bora N. 2012. Large-scale production of secreted proteins in *Pichia pastoris*. Methods in Molecular Biology 866:217-35

10. Buchetics M, Dragosits M, Maurer M, Rebnegger C, Porro D, Sauer M. 2011. Reverse engineering of protein secretion by uncoupling of cell cycle phases from growth. *Biotechnology and Bioengineering* 108(10):2403–12.
11. Çalık P, Ata Ö, Güneş H, Massahi A., Boy E, Keskin A, Özdamar TH. 2015. Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochemical Engineering Journal*, 95, 20–36.
12. Celik E, Calik P: 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* 30:1108-1118.
13. Cereghino JL, Cregg JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology. Reviews*. 24(1): 45-66.
14. Corro-Mendivil, DN. 2017. Efecto de la expresión del gen heterólogo hGH en el comportamiento fisiológico de *Pichia pastoris*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León
15. Cox MM. 2012. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine* 30:1759-1766
16. Daly R, Hearn MT. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18(2):119–138.
17. 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.
18. Demain AL, Vaishnav P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* 27:297-306.
19. Doolittle, R.F. (1989) Redundancies in protein sequences. In *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (Fasman, G.D., ed.), pp. 599–623, Plenum Press, New York
20. Eck A, Schmidt M, Hamer S, Ruff AJ, Förster J, Schwaneberg U. 2018. Improved microscale cultivation of *Pichia pastoris* for clonal screening. *Fungal Biology and Biotechnology* 5(1):1–14.

21. Faust G, Janzen NH, Bendig C, Römer L, Kaufmann K, Weuster-Botz D. 2014. Feeding strategies enhance high cell density cultivation and protein expression in milliliter scale bioreactors. *Biotechnology Journal* 9(10):1293–303.
22. Fei L, Wang Y, Chen S. 2009. Improved glutathione production by gene expression in *Pichia pastoris*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32(6):729–35.
23. Félix-Castro MB. 2013. Análisis de la expresión de genes involucrados en los procesos de secreción, proteólisis y metabolismo del metanol de la clona KM71FTEII de *Pichia pastoris* cultivada a dos condiciones de cultivo. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
24. Fernandez-Cano, KB. 2015. Analisis transcripcional de la vía de secreción y metabolismo del metanol durante la producción de una proteína heteróloga en *Pichia pastoris*. Tesis de maestría. Universidad Autonoma de Nuevo León.
25. Ferreira AR, Ataíde F, Von Stosch M, Dias JML, Clemente JJ, Cunha AE. 2012. Application of adaptive DO-stat feeding control to *Pichia pastoris* X33 cultures expressing a single chain antibody fragment (scFv). *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35(9):1603–14.
26. Ferrer-Miralles N, Domingo-Espin J, Corchero JL, Vazquez E, Villaverde A. 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* 8:17
27. Garcia-Ortega X, Adelantado N, Ferrer P, Montesinos JL, Valero F. 2016. A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*: From specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. *Process Biochemistry* 51(6):681–91
28. García-Ortega X, Cámara E, Ferrer P, Albiol J, Montesinos-Seguí JL, Valero F. 2019. Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol-free GAP promoter. Where do we stand? *New Biotechnology*;53(June):24–34.
29. Garcia-Ortega X, Ferrer P, Montesinos JL, Valero F. 2013. Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 172–181.
30. 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.
31. Gasser B, Sauer M, Maurer M, Stadlmayr G, Mattanovich D. 2007. Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 73(20):6499–507.
  32. Guan B, Chen F, Lei J, Li Y, Duan Z, Zhu R. 2013. Constitutive expression of a rhIL-2-HSA fusion protein in *Pichia pastoris* using glucose as carbon source. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171(7):1792–804.
  33. Guerrero-Olazarán M, Fernández-Cano KB, Viader-Salvadó JM. 2015. Transcriptional analysis of *Pichia pastoris* under processes of high and low levels of recombinant protein. 8th Conference on Recombinant Protein Production, Palma de Mallorca (España), 22-24 de Abril de 2015.
  34. Guerrero-Olazarán M, Rodríguez-Blanco L, Carreon-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.
  35. Hartner FS, Ruth C., Langenegger D, Johnson SN, Hyka P, Lin-Cereghino GP, Glieder A. 2008. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research*, 36(12), e76–e76.
  36. Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Bona R, Rumbold K, Luckl J. 1997. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expression and Purification* 11:61–7.
  37. Heid C, Stevens J, Livak K, Williams P. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10): 986-994.
  38. Hemmerich J, Adelantado N, Barrigón JM, Ponte X, Hörmann A, Ferrer P. 2014.. Comprehensive clone screening and evaluation of fed-batch strategies in a microbioreactor and lab scale stirred tank bioreactor system: Application on *Pichia pastoris* producing *Rhizopus oryzae* lipase. *Microbial Cell Factories* 13(1):1–16.

39. 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
40. Hollander JA De. 1993. Kinetics of microbial product formation and its consequences for the optimization of fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek*.63(3-4):375-81.
41. Hu XQ, Chu J, Zhang Z, Zhang SL, Zhuang YP, Wang YH, Guo MJ, Chen HX, Yuan ZY. 2008. Effects of different glycerol feeding strategies on S-adenosyl-l-methionine biosynthesis by PGAP-driven *Pichia pastoris* overexpressing methionine adenosyltransferase, *Journal of Biotechnology*. 137:44-49.
42. Huang J, Wang Q, Bu W, Chen L, Yang Z, Zheng W. 2019. Different construction strategies affected on the physiology of *Pichia pastoris* strains highly expressed lipase by transcriptional analysis of key genes. *Bioengineered* 10(1):150-61.
43. Jahic M, Wallberg F, Bollok M, Garcia P, Enfors S-O. 2003. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microbial cell factories* 2:6.
44. Jiao L, Zhou Q, Su Z, Xu L, Yan Y. 2018. High-level extracellular production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* via a strategy combining optimization of gene-copy number with co-expression of ERAD-related proteins. *Protein Expression and Purification* 147:1-12.
45. Khasa YP, Khushoo A, Srivastava L, Mukherjee KJ. 2007. Kinetic studies of constitutive human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) expression in continuous culture of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters* 29(12):1903-8.
46. Kim H, Yoo SJ, Kang, HA. 2014. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Research* 15:1-16
47. Kim N, Choi Y, Jung S, Kim S. 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):1-8.
48. Koressaar T, Remm M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 23(10): 1289-91.



49. 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
50. Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, Stenger C, Costa M, Camattari A, Fotiadis, D, Kovar, K. 2015. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances* 33(6):1177–93.
51. Looser V, Lüthy D, Straumann M, Hecht K, Melzoch K, Kovar K. 2017. Effects of glycerol supply and specific growth rate on methanol-free production of CALB by *Pichia pastoris*: functional characterisation of a novel promoter. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(8):3163–76.
52. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22:249–70
53. Mao R, Teng D, Wang X, Zhang Y, Jiao J, Cao X. 2015. Optimization of expression conditions for a novel NZ2114-derived antimicrobial peptide-MP1102 under the control of the GAP promoter in *Pichia pastoris* X-33. *BMC Microbiology* 15(1):57
54. Martínez JL, Liu L, Petranovic D, Nielsen J. 2012. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(6), 965–971.
55. Maurer M, Kühleitner M, Gasser B, Mattanovich D. 2006. Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories* 5:1–10.
56. Menéndez C, Hernández L, Banguela A, País J. 2004. Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology* 34(5):446–52.
57. Morrow KJ: 2007. Improving protein production processes. *Genetic Engineering News* 27:50-54.
58. Nolan RP, Lee K.:2002. Dynamic model for CHO cell engineering. *Journal of Biotechnology* 158:24-33.
59. Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.*29 (9): e45–e45.

60. Pfaffl MW. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. In: AZ of quantitative PCR, Bustin SA (Ed), International University Line (IUL), La Jolla, CA. pp. 89-113.
61. Pfaffl MW. 2004. Relative quantification. In: Real-time PCR, Dorak T (ed.) International University Line, pp.63-82.
62. Porro D, Gasser B, Fossati T, Maurer M, Branduardi, P, Sauer M, Mattanovich D. 2011. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology, 89(4), 939–948.
63. Qin X, Qian J, Yao G, Zhuang Y, Zhang S, Chu J. 2011. GAP Promoter Library for Fine-Tuning of Gene Expression in *Pichia pastoris*. Applied and Environmental Microbiology, 77(11), 3600–3608.
64. Reichelt WN, Brillmann M, Thurrold P, Keil P, Fricke J, Herwig C. 2017. Physiological capacities decline during induced bioprocesses leading to substrate accumulation. Biotechnology Journal 12(7):1–25.
65. 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.
66. Schmideder A, Hensler S, Lang M, Stratmann A, Giesecke U, Weuster-Botz D. 2016. High-cell-density cultivation and recombinant protein production with *Komagataella pastoris* in stirred-tank bioreactors from milliliter to cubic meter scale. Process Biochemistry 51(2):177–84.
67. Schwarzhans JP, Wibberg D, Winkler A, Luttermann T, Kalinowski J, Friehs K. 2016. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. Microbial Cell Factories 15(1):1–15.
68. Schwarzhans JP, Wibberg D, Winkler A, Luttermann T, Kalinowski J, Friehs K. 2016. Non-canonical integration events in *Pichia pastoris* encountered during standard transformation analysed with genome sequencing. Scientific Reports 1–12.
69. Shavers CL, Parsons ML, Deming SN. 1979. Simplex optimization of chemical systems. Journal of Chemical Education 56:307-309.

70. Shi L, Wang J, Wang X, Zhang Y, Song Z, Cai M. 2019. Transcriptome and metabolome analyses reveal global behaviour of a genetically engineered methanol-independent *Pichia pastoris* strain. *Process Biochemistry* 76:46–54.
71. Sohn SB, Graf AB, Kim TY, Gasser B, Maurer M, Ferrer P, Mattanovich D, Lee SY. 2010. Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for in silico analysis of heterologous protein production. *Biotechnology Journal*. 5(7): 705-715.
72. 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.
73. Sun H, Bankefa OE, Ijeoma IO, Miao L, Zhu T, Li Y. 2017. Systematic assessment of *Pichia pastoris* system for optimized  $\beta$  -galactosidase production. *Synthetic and Systems Biotechnology* 2(2):113–20.
74. Tajssoleiman T, Mears L, Krühne U, Gernaey K V. 2019. Cornelissen S. An Industrial Perspective on Scale-Down Challenges Using Miniaturized Bioreactors. *Trends in Biotechnology* 37(7):697–706.
75. Tamura N, Oku M, Sakai Y. 2010. Atg8 regulates vacuolar membrane dynamics in a lipidation-independent manner in *Pichia pastoris*. *Journal of Cell Science* 123(23):4107–16.
76. Tang S, Reiche A, Potvin G, Zhang Z. 2010. Modeling of Phytase Production by Cultivation of *Pichia pastoris* Under the Control of the GAP Promoter. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* 8(1).
77. 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
78. Viader-Salvadó JM, Cab-Barrera EL, Galán-Wong LJ, Guerrero-Olazarán M. 2006. Genotyping of recombinant *Pichia pastoris* strains. *Cellular and Molecular Biology Letters* 11(3):348–59.
79. Viader-Salvadó JM, Castillo-Galván M, Fuentes-Garibay JA, Iracheta-Cárdenas MM, Guerrero-Olazarán M. 2013. Optimization of five environmental factors to

- increase beta-propeller phytase production in *Pichia pastoris* and impact on the physiological response of the host. *Biotechnology progress* 29(6):1377–85.
80. Vogl T, Glieder A. 2013. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnology*, 30(4), 385–404.
  81. Vogl T, Gebbie L, Palfreyman RW, Speight R. 2018. Effect of plasmid design and type of integration event on recombinant protein expression in *Pichia pastoris* *Applied and Environmental Microbiology* 84(6).
  82. Wang J, Wang X, Shi L, Qi F, Zhang P, Zhang Y. 2017. Methanol-Independent Protein Expression by AOX1 Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in *Pichia pastoris*. *Scientific Reports* 7:1–12.
  83. Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene and Regulation and Use of its Promoter. *Gene*. 86(1): 37-44.
  84. Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, A. B., Figueroa, C. a., Pessoa, A., & Farías, J. G. (2013). Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1043–1048.
  85. Werten MW, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, de Wolf FA. 1999. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* 15:1087–96
  86. Zhao W, Wang J, Deng R, Wang X. 2008. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35(3):189–95.
  87. Zhu T, Sun H, Li P, Xue Y, Li Y, Ma Y. 2014. Constitutive expression of alkaline  $\beta$ -mannanase in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* 49(12):2025–9.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

Ana Lucía Herrera Estala

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología

**Tesis:** RESPUESTA FISIOLÓGICA DE CEPAS DE *Pichia pastoris* A CONDICIONES DE SOBREPDUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS REGULADAS POR EL PROMOTOR CONSTITUTIVO *GAP*

Campo de estudio: Biotecnología Molecular y Bioprocesos

Biografía:

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 3 de Abril de 1991, hija de Eleazar Herrera Escobar y María Natividad Estala Acevedo.

Educación: Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autonoma de Nuevo León. Grado obtenido: Licenciado en Biotecnología Génomica (cédula 9763373)

Experiencia Profesional:

Elaboración de tesis de Licenciatura en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biologicas (U.A.N.L.) 2014-2015.

Elaboración de tesis de Doctorado en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biologicas (U.A.N.L.) desde agosto de 2015.