XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

BIOTECNOLOGÍA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES CON *PICHIA PASTORIS*

José M. Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL,
Av. Pedro de Alba s/n, Col. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México, 66450.
(81) 83294000 ext. 6439, jose.viadersl@uanl.edu.mx

Palabras clave: Pichia pastoris, proteínas recombinantes

Pichia pastoris es una levadura muy utilizada actualmente como sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes, tanto para investigación básica como para fines industriales, debido a su fácil manipulación genética, a los altos niveles de producción tanto intra como extracelular de la proteína de interés, la habilidad de realizar modificaciones postraduccionales similares a las de los organismos eucariontes superiores (glicosilación, puentes disulfuro y procesado proteolítico) que generan un plegamiento correcto de la proteína, y en el caso de expresión extracelular, a las etapas sencillas de concentración y purificación de la proteína recombinante. Este sistema de expresión emplea vectores de integración que generan una estabilidad génica incluso en procesos a gran escala. Los cultivos se realizan con medios mínimos sencillos y económicos, y son escalables. Los parámetros que influyen en la productividad y actividad de la proteína recombinante (pH, aireación, velocidad de adición de la fuente de carbono, etc.) son controlados fácilmente. Proteínas difíciles de producir en otros sistemas de expresión han sido producidas con éxito en *P. pastoris*. Todo esto hace a *P. pastoris* un sistema de elección para la producción de proteínas recombinantes.

Nosotros iniciamos a trabajar con la levadura *P. pastoris* hace 17 años. En nuestro grupo de trabajo han participado y participan estudiantes voluntarios de diversas licenciaturas, estudiantes de servicio social, y estudiantes de tesis de licenciatura, maestría y doctorado. Hasta la actualidad se han construido cepas recombinantes de *P. pastoris* con fenotipos Mut^+ y Mut^s (utilización de metanol tipo positiva y lenta, respectivamente) que secretan al medio de cultivo once proteínas diferentes. Hemos podido constatar que la selección de la cepa recombinante al momento de la integración del gen heterólogo en el genoma de la levadura aumenta tres veces la producción de la proteína recombinante, el uso de biorreactores de 10 a 100 veces, la optimización de las condiciones de cultivo otras tres veces más y el uso de genes sintéticos con codones preferenciales 15 veces más. Todo esto nos ha llevado a niveles de proteína recombinante en el medio de cultivo del orden de 10 g/L. Además se han desarrollado estrategias de concentración y purificación de la proteína recombinante producida.

Con una de las cepas construidas se realizó una transferencia tecnológica y tres patentes (1). Conjuntando técnicas de ingeniería de proteínas y el uso de genes sintéticos se mejoró la termoestabilidad y se consiguió la sobreproducción de una enzima de utilidad en la nutrición de especies acuícolas agástricas (2). Con otra de las cepas se hizo un estudio comparativo del efecto en la fisiología de *P. pastoris* y en la producción de la proteína recombinante al cultivar esta cepa en medio líquido sumergido o sobre soporte sólido (3). Con tres de las cepas se están haciendo estudios para determinar las propiedades bioquímicas de las proteínas debido a su difícil obtención de su fuente natural, y además se han desarrollado estrategias para producir en *P. pastoris* proteínas tóxicas para el hospedero (4). Con otra de las proteínas producidas se está realizando una evaluación en campo para su aplicación comercial en la nutrición animal (5) y simultáneamente se están realizando estudios de escalamiento del proceso. Por último, estamos trabajando en la construcción de dos nuevas cepas de *P. pastoris* productoras de proteínas con utilidad en el área de alimentos y en un proyecto de ingeniería metabólica de *P. pastoris*.

Agradecimientos. Agradecemos la participación científica y técnica de muchos estudiantes, con los cuales vivimos momentos de alegría al conseguir los objetivos propuestos gracias a la constancia de trabajo. Además, agradecemos el apoyo económico por parte del CONACYT y del PAICYT de la UANL.

Bibliografía.

1. Guerrero-Olazarán M, Barrera-Saldaña HA, Viader-Salvadó JM, (2002). Modified methylotrophic *Pichia pastoris* yeast which secretes human growth hormone. U.S. patent 6,342,375 B1.
2. Viader-Salvadó JM, Gallegos-López JA, Carreón-Treviño JG, Castillo-Galván M, Rojo-Domínguez A, Guerrero-Olazarán M. (2010). Design of thermostable beta-propeller phytases with a broad range of pH activity and their overproduction by *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(19): 6423–6430.
3. López M, Guerrero-Olazarán M, Viader-Salvadó JM, Gallegos-López JA, Favela-Torres E, Fernández FJ, Loera O, Viniegra-González G. (2010). Cell growth and *Trametes versicolor* laccase production in transformed *Pichia pastoris* cultured by solid-state or submerged fermentations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85(4): 435-440.
4. Guerrero-Olazarán M, Escamilla-Treviño LL, Castillo-Galván M, Gallegos-López JA, Viader-Salvadó JM. (2009). Recombinant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) trypsinogen production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.* 25(5): 1310-1316.
5. Gamboa J, Hernández C, Cuzon G, Guerrero M, Gaxiola G. (2010). Efecto de dos métodos de inclusión de fitasa en dietas con proteína vegetal para juveniles de *F. duorarum*. *X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. San Nicolás de los Garza N.L. México. 8-10 noviembre de 2010.