Niveles de producción de interferón alfa-2 recombinante por células de *Saccharomyces cerevisiae* libres e inmovilizadas

G. PÉREZ, M. QUINTANA, Y. QUIÑONES, J. VEGA y C. CHUAY

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

Recibido en septiembre de 1989
Aprobado en noviembre de 1989

RESUMEN

En este trabajo se emplean células de *Saccharomyces cerevisiae*, portando dos construcciones genéticas para la secreción de interferón α-2. Se estudian los cultivos de las células libres (en reactores convencionales) e inmovilizadas en alginato de sodio. Se alcanzan niveles de interferón α-2 extracelular de 4-8 X 10e6 UI/ml, y productividades de hasta 15 mg de interferón por litro de volumen útil de reactor y por hora cuando se emplea una concentración celular de 0,05 g de biomasa húmeda por mililitro de gel en la inmovilización.

SUMMARY

Saccharomyces cerevisiae cells carrying two genetic constructions for the secretion of α-2 Interferon are used in this work. Cultures of free cells (in conventional reactors) and immobilized cells in sodium alginate are studied. Levels of extracellular α-2 Interferon around 4-8 X 10e6 IU/ml are achieved. Productivities reaching 15 mg of Interferon per liter of reactor useful volume and per hour are obtained when a cellular concentration of 0,05 g wet biomass per ml of gel in the immobilization is used.

INTRODUCCION

El empleo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de interferón recombinante ofrece ventajas con respecto al empleo de bacterias, pues no produce endotoxinas y ha sido usada en fermentaciones industriales durante muchos años, conociéndose profundamente sus sistemas fisiológicos y metabólicos. Además, es posible lograr la secreción de las proteínas producidas al medio de cultivo, mediante el sistema del factor α, lo que facilita la purificación posterior. También se han alcanzado altos niveles de expresión de proteínas recombinantes empleando el promotor de la gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (GFD) en esta levadura (Brake *et al.*, 1984; Bitter *et al.*, 1984; Singh *et al.*, 1984; Carty *et al.*, 1987; Kingsman *et al.*, 1987).

Por otra parte, la inmovilización de células vivas, sean o no portadoras de plasmidios, ofrece una serie de ventajas con respecto a los métodos tradicionales de fermentación, como: mayor productividad con motivo de las altas concentraciones celulares que se alcanzan en el soporte (Dhulster *et al.*, 1984; Georgiou *et al.*, 1985); menores costos de inversión (Luong y Tseng, 1984); mayores tiempos de vida del biorreactor (Thonart *et al.*, 1983); simplificación de las etapas de recobrado que comprenden la separación del producto (Blanch, 1983) y también algunos cambios fisiológicos en las células (Mattiason *et al.*, 1984).

Copyright © 1990, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón y Biotecnología en Salud. Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba

En caso de que las células sean portadoras de plasmidios recombinantes, la inmovilización ofrece una ventaja adicional, que consiste en una mayor estabilidad del plasmidio, lo que puede deberse al crecimiento celular compartimentado que se logra en el soporte y a las limitaciones en la difusión que conducen a la formación de un gradiente de velocidades de crecimiento celular, y también del número de copias del plasmidio (De Taxis du Poêt *et al.*, 1986; De Taxis de Poêt *et al.*, 1987; Nasri *et al.*, 1987).

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* portadora de plasmidios recombinantes, en los que el gen que codifica para el interferón α-2 ha sido acoplado a sistemas eficientes de excreción. Se estudian algunos aspectos del cultivo de las células libres en un fermentador de pequeño volumen y también en reactores con esas células inmovilizadas en alginato de sodio.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Los componentes de los medios de cultivo (hidrolizado de caseína, peptona y extracto de levadura) provienen de la OXOID (Inglaterra). Todos los demás reactivos son de grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales.

Microorganismo y plasmidios

Se utilizó la *Saccharomyces cerevisiae*, cepa SEY2202 (alfa, leu 2-3, ura 3-52, his 4-519), con dos vectores o plasmidios de expresión que permiten una secreción eficiente en condiciones aeróbicas del interferón α-2.

En el plasmidio pYCB115, el gen que codifica para el interferón α-2 se encuentra bajo el control del promotor del factor alfa del tipo de apareamiento. Contiene, además, el gen que codifica para el uracilo 3 (marcador de selección), así como el fragmento del 2u como origen de replicación.

El otro vector empleado, llamado pYCB129, contiene el gen del interferón bajo el promotor de la gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa, así como el péptido señal del factor alfa, un gen defectivo para la leucina y el gen del uracilo 3.

La selección se basó en la auxotrofia de la cepa, pudiendo crecer en un medio sin uracilo aquellas células que incorporaron el plasmidio.

Este trabajo de clonación se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética del Centro de Investigaciones Biológicas y del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (De la Fuente *et al.*, 1988).

Medios y condiciones de cultivo para las células libres

Se empleó el medio GO (Galzy y Slonimski, 1957) suplementado con los requerimientos auxotróficos del microorganismo. La temperatura de cultivo fue 30°C. El preinóculo se creció durante 24 horas y el inóculo se realizó en zaranda orbital a 240 rpm durante 12 horas.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en un reactor LKB (modelo 1601) de 3 litros de volumen de trabajo, con dos variantes:

1) Medio GO + requerimientos auxotróficos;
2) Medio GO + hidrolizado de caseína (2% p/v concentración final).

El tiempo de fermentación en ambas variantes fue de 22 horas. El pH se mantuvo en 6,6 ± 0,2 con NaOH 3 N. La agitación fue de 450 rpm y la aereación de 1 vvm (volumen de aire por volumen de líquido por minuto).

Se tomaron muestras del cultivo periódicamente para determinar la actividad biológica del interferón α-2 en los sobrenadantes.

Procedimiento de inmovilización

Las células para inmovilizar fueron colectadas por centrifugación de los cultivos fermentados a 3 500 g por 15 minutos, y fueron lavadas dos veces con buffer Tris-HCl 50 mM (pH = 8,0), NaCl 30 mM. Esta masa celular fue mezclada hasta homogeneización con una solución de alginato de sodio a 30°C, preparada al 2% p/v en agua destilada y "autoclaveada". Esta mezcla fue bombeada a través de agujas hipodérmicas y las gotas resultantes se fueron colectando en una solución de $CaCl_2$–$2H_2O$ (2M), con agitación suave a temperatura ambiente, conservándose aquí durante 30 minutos, con el fin de aumentar la resistencia mecánica de las perlas esféricas de alginato-células. El diámetro promedio de las perlas fue de 3-4 mm. Se prepararon mezclas de la solución de alginato y células a dos densidades celulares: 0,05 y 0,10 gramos de biomasa húmeda por mililitro de gel. Todo el procedimiento de inmovilización celular se desarrolló bajo condiciones estériles.

Características del reactor y condiciones de cultivo de las células inmovilizadas

El reactor empleado consistió en una columna de vidrio, con un volumen de trabajo de 600 cm^3, siendo sus dimensiones en diámetro (D) y altura (L), de 5 y 30 cm respectivamente.

El suministro de oxígeno a las células se logró con un flujo de aire equivalente a 1 vvm, alimentado a través de un filtro bacteriológico en línea y una frita porosa ubicada en la parte inferior de la columna,

manteniéndose las perlas de alginato-células en un régimen fluidizado. La temperatura de trabajo se mantuvo en 30°C, trabajándose todo el sistema en un cuarto de incubación.

El medio de cultivo estéril se alimentó al reactor de forma continua, a un flujo de 330 ml/h (tiempo de retención de 1,8 horas) mediante una bomba peristáltica. El medio efluente se extrajo de la misma forma y se colectó en un recipiente mantenido en hielo.

Se emplearon los medios de cultivo siguientes:

A) Medio GO + hidrolizado de caseína (2%) + extracto de levadura (1%) + glucosa (2%).

B) Hidrolizado de caseína (1%) + extracto de levadura (0,5%) + glucosa (2%).

C) Peptona (1%) + extracto de levadura (0,5%) + glucosa (2%).

En todos los casos se utilizó $CaCl_2$–$2H_20$ a una concentración final de 50 mM en el medio de cultivo para ayudar a conservar la rigidez de las perlas. Todas las experiencias efectuadas con estos reactores se realizaron por duplicado de forma independiente.

Actividad biológica del interferón α-2

La actividad antiviral del interferón α-2 en los sobrenadantes de los cutlivos se determinó mediante la técnica de inhibición del efecto citopatogénico del virus Mengo en células Hep-2 de tumor laríngeo humano, comparándose con un estándar internacional de interferón α (Barcelona, 1983).

Crecimiento celular

El crecimiento celular se siguió por la turbidez del medio, midiendo la absorbancia a 540 nm en un fotocolorímetro Klett-Summerson.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cultivo de células libres

Se realizaron fermentaciones con las dos construcciones genéticas: pYCB115 y pYCB129, empleando las dos variantes de medio de cultivo. En la tabla 1 se muestran los niveles promedio de interferón α-2 extracelular alcanzados durante los procesos fermentativos correspondientes a tres experimentos independientes.

Se observa que los mayores niveles de secreción del interferón α-2 al medio de cultivo se logran con la construcción pYCB129, en la cual se emplea el promotor de la gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa, particularmente con el medio GO suplementado con hidrolizado de caseína al 2% (concentración final). La concentración de la proteína en el sobrenadante del cultivo alcanza su máximo valor a las 16 horas de fermentación, y posteriormente decae, lo cual puede deberse a la acción de proteasas. Esto ocurre con ambas construcciones genéticas, pero el descenso es más marcado en el caso del pYCB115.

Tabla 1
NIVELES DE INTERFERON ALFA-2 EN LOS CULTIVOS DE CELULAS LIBRES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Tiempo de cultivo (h)	pYCB115		pYCB129	
	Medio 1	Medio 2	Medio 1	Medio 2
8	$2,2 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$
12	$1,2 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$
16	$1,7 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^6$	$8,0 \cdot 10^6$
22	$2,2 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^6$

* Medio 1: GO + requerimientos auxotróficos
Medio 2: GO + hidrolizado de caseína (2%)
Los niveles de interferón se expresan en UI/ml de cultivo.

En pruebas adicionales con la construcción pYCB129 en el medio 2, se comprobó que el porcentaje que representa el interferón extracelular con respecto al interferón total producido por la célula va aumentando durante el proceso fermentativo hasta llegar a un máximo a las 16 horas de cultivo, donde el interferón extracelular corresponde al 80% y el interferón intracelular y periplasmático al 20% del interferón total en el cultivo. Estos valores dan una idea de la eficiencia en el proceso de secreción de la proteína clonada con el promotor GFD.

También se determinó en este caso la variación de la actividad de interferón α extracelular por unidad de volumen de cultivo y por unidad de densidad óptica, durante la fermentación. En la figura 1 se observa que a las 16 horas de cultivo, esta actividad específica alcanza un valor máximo de 6,9 X 10e5 UI/ml - uA540, teniendo el cultivo una densidad óptica de 11,6 U.

Cultivo de células inmovilizadas

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los cultivos con las células libres, se seleccionó la construcción pYCB129 y el medio de cultivo 2, y se realizó la fermentación hasta las 16 horas, con vistas a obtener células en buenas condiciones productivas para su inmovilización. El procedimiento seguido para ello, así como el montaje del reactor de células inmovilizadas y las condiciones de cultivo se describen en *Materiales y Métodos*.

Se montaron tres reactores con las características explicadas, en los cuales se empleó una densidad celular de 0,05 g de biomasa húmeda por mililitro de gel. La diferencia entre estos reactores I, II y III es el medio de cultivo empleado: A, B y C respectivamente, cuya composición se detalla en *Materiales y Métodos*.

En la figura 2 se muestran los niveles de interferón α-2 en los sobrenadantes de los

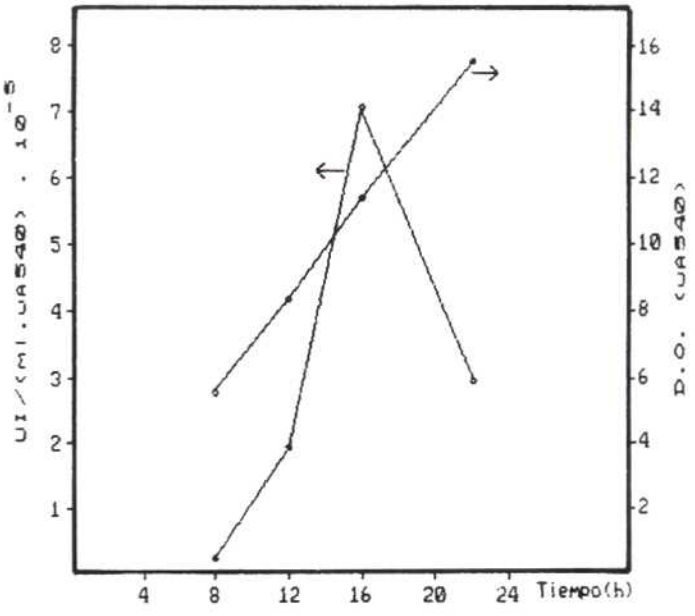

FIG. 1. Crecimiento celular y actividad de interferón α-2 extracelular por mililitro de cultivo y por unidad de densidad óptica con la construcción pYCB129 en el medio 2 (GO + hidrolizado de caseína al 2%).

efluentes de cada reactor durante el tiempo de operación. En los reactores I y II se produce un brusco descenso de la concentración de interferón en las primeras 20 horas de operación, junto con un aumento significativo de la turbidez del medio y una reducción evidente del número de perlas dentro de los reactores. Esto puede deberse al hecho de que las concentraciones iónicas presentes en los medios de cultivo A y B, aportadas por las sales G y por el hidrolizado de caseína (este principalmente en cloruro de sodio, entre otros), afectan la estabilidad mecánica del gel de alginato, a pesar de la presencia de $CaCl_2$ como agente estabilizante en esos medios, provocando, por tanto, la redisolución gradual de las perlas.

La concentración de interferón en el efluente del reactor III va aumentando gradualmente hasta las 70 horas de operación, y desde este momento hasta las 190 horas se mantiene en un valor de 5-6 X 10e6 UI/ml, de forma estable. Estos niveles son similares a los obtenidos en la fermentación con las células libres a partir de las 16 horas de cultivo, por lo que este sistema constituye una alternativa a valorar para la producción en forma estable y continua, en mayor escala, de esta proteína recombinante. En este caso, la estabilidad mecánica de las perlas se mantuvo durante el tiempo de funcionamiento del sistema (el contenido de iones aportado por la peptona al medio de cultivo, principalmente en forma de cloruros, es 12-13 veces menor que el aportado por el hidrolizado de caseína, según datos del fabricante).

Con el propósito de estudiar el efecto de una mayor densidad celular en las perlas sobre los niveles de interferón resultantes, se montó el reactor IV, en el cual se emplea una densidad de 0,10 g de biomasa húmeda por mililitro de gel. Como medio de cultivo se utilizó el empleado en el reactor III. En la figura 2 se observa que a partir de las 20 horas de operación, la concentración de interferón en el efluente se mantiene en un valor de 1-2 X 10e6 UI/ml, conservando el gel su estabilidad mecánica.

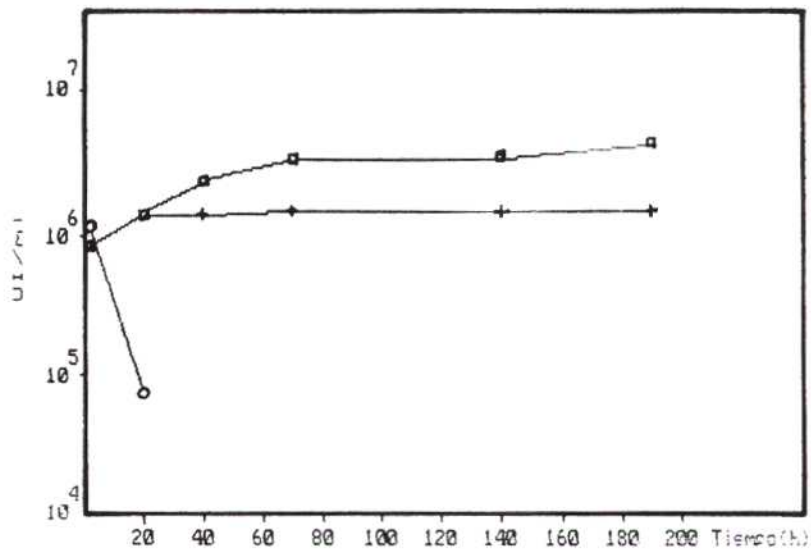

FIG. 2. Niveles de interferón alfa-2 en los efluentes de los reactores de células inmovilizadas.
o: Reactores I y II
: Reactor III
+: Reactor IV

Comparando los resultados de los reactores III y IV, se observa una disminución de tres veces en los niveles de interferón obtenidos cuando la concentración de biomasa en el gel se duplica. Esto se explica por las limitaciones en el proceso de difusión de nutrientes y de oxígeno desde la fase líquida hasta las células en la matriz, lo que se agrava a medida que la densidad celular aumenta, pues se refuerza la barrera difusional.

Se ha reportado también por varios autores (Adlercreutz *et al.*, 1985; Gosmann y Rehm, 1986) que a mayores concentraciones celulares en la matriz, la respiración específica disminuye y la velocidad de consumo absoluta de oxígeno permanece constante a pesar del incremento en la cantidad de células por mililitro de gel, lo cual puede llevar a una disminución en la actividad específica de esa biomasa.

Productividad de los sistemas estudiados

Se expresó la productividad como miligramos de interferón α producidos por unidad de volumen útil del reactor y por unidad de tiempo (1 mg de interferón α corresponde a 2 X 10e8 UI). En el caso de la fermentación con las células libres en un reactor convencional, se tomaron 20 horas como tiempo de un ciclo completo, considerando su preparación y esterilización.

Los valores de productividad alcanzados se muestran en la figura 3. Se observa que con el reactor III, en el cual se empleó la concentración celular menor, se alcanzan productividades muy superiores a las del reactor IV y el reactor convencional para el cultivo de células libres (3 y 7,5 veces superior, respectivamente).

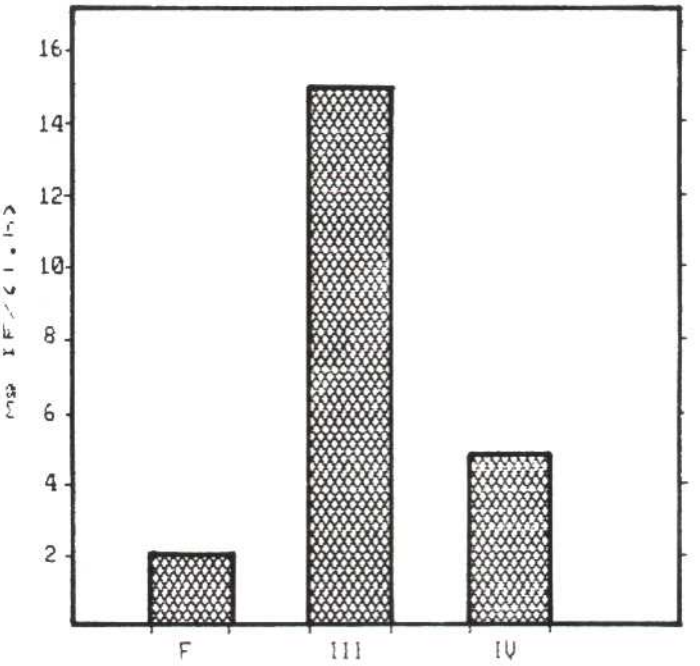

FIG. 3. Valores de productividad alcanzados en los sistemas de cultivo empleados.
F: reactor convencional (células libres)
III y IV: reactores de células inmovilizadas (0,05 y 0,10 g de biomasa húmeda por mililitro de gel respectivamente)

Se ha visto la factibilidad de emplear estos sistemas en distintas producciones, por las ventajas previamente descritas. En nuestro caso, es necesario profundizar en estos estudios con vistas a obtener su mayor aprovechamiento, ya que existen múltiples parámetros que influyen de forma decisiva en la operación de estos sistemas, siendo una fuente potencial para su optimización, además de la estabilidad de las células productoras obtenidas mediante manipulaciones genéticas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Raúl Poutou la colaboración prestada para el desarrollo de este trabajo, y a José Motolongo el apoyo brindado en la confección de las figuras.

REFERENCIAS

ADLERCREUTZ, P.; O. HOLST y B. MATTIASSON (1985). *Characterization of* Gluconobacter oxydans *immovilized in calcium alginate*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **22**: 1-7.

BARCELONA, S. (1983). *Determinación de la actividad de interferón*. Memorias del I Seminario Cubano sobre Interferón, La Habana, pp. 47-51.

BITTER, G. A.; K. K. CHEN; A. R. BANKS y P. H. LAI (1984). *Secretion of foreign proteins from* Saccharomyces cerevisiae *directed by alfa-factor gene fusions*. Proc. Natl. Acad. Sci. **81**: 5330-5334.

BLANCH, H. W. (1983). *Engineering challenges of genetic engineering*. Biotechnol. Bioeng. Symp. **13**: 467-479.

BRAKE, A. I.; J. P. MERRYWEATHER; D. G. COIT; A. U. HEBERLEU; F. R. MASIARZ; G. T. MULLEUBACH; M. S. CHDEA; P.VALENZUELA y P. J. BARR (1984). *Alfa-Factor directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in* Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. **81**: 4642-4646.

CARTY, C. E.; F. X. KOVACH; W. J. McALEER y R. Z. MAIGETTER (1987). *Fermentation of recombinant yeast producing hepatitis B surface antigen*. J. Ind. Microbiol. **2**: 117-121.

DE LA FUENTE, J.; A. HERRERA; A. SILVA; S. PEREZ; M. QUINTANA; J. DELGADO; J. FERNANDEZ y L. HERRERA (1988). *Expresión y secreción del interferón alfa-2 por la levadura* Saccharomyces cerevisiae. Interferón y Biotecnología **5**: 125-132.

DE TAXIS DU POÊT, P.; P. DHULSTER; J. N. BARBOTIN y D. THOMAS (1986). *Plasmid inheritability and biomass production: comparison between free and immobilized cell cultures of* Escherichia coli *BZ18 (pTG201) without selection pressure*. J. Bacteriol. **165**: 871-877.

DE TAXIS DU POÊT, P.; Y. ARCAND; R. BERNIER, Jr; J. N. BARBOTIN y D. THOMAS (1987). *Plasmid stability in immobilized and free recombinant* Escherichia coli *JM105 (pKK223-200): importance of oxygen diffusion growth rate and plasmid copy number*. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 1548-1555.

DHULSTER, P.; J. N. BARBOTIN y D. THOMAS (1984). *Culture and bioconversion use of plasmid-harboring strain of immobilized* Escherichia coli. Appl. Microbiol. Biotechnol. **20**: 87-93.

GALZY, P. y P. P. SLONIMSKI (1957). *Variation physiologique de la levure au course de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone*. Comptes. Rend. Acad. Sci. (París) **245**: 2423.

GEORGIOU, G.; J. J. CHALMERS; M. L. SCHULER y D. B. WILSON (1985). *Continuous immobilized recombinant protein production from* Escherichia coli *capable of selective excretion: a feasibility study*. Biotechnol. Progress **1**: 75-79.

GOSMANN, B. y H. J. REHM (1986). *Oxygen uptake of microorganisms entrapped in Ca-alginate*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **23**: 163-167.

KINGSMAN, S. M.; A. J. KINGSMAN y J. MELLOR (1987). *The production of mammalian proteins in* Saccharomyces cerevisiae. Trends Biotechnol. **5**: 53-57.

LUONG, J. H. T. y M. C. TSENG (1984). *Process and technoeconomics of ethanol production by immobilized cells*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **19**: 207-216.

MATTIASSON, B.; M. LARSSON y B. HAHN-HÄGERDAL (1984). *Metabolic behaviour of immobilized cells. Effects of some microenvironmental factors*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **434**: 475-478.

NASRI, M.; S. SAYADI; J. N. BARBOTIN y D. THOMAS (1987). *The use of the immobilization of whole living cells to increase stability of recombinant plasmids in* Escherichia coli. J. Biotechnol. **6**: 147-157.

SINGH, A.; J. M. LUGOVOY; W. J. KOHR y L. J. PERRY (1984). *Synthesis, secretion and processing of alfa-factor-interferon fusion proteins in yeast*. Nucleic Acid Research **12**: 8927-8938.

THONART, P.; M. PAQUOT; B. BAIJOT y D. DALEMANS (1983). *Les cellules immobilisées, techniques du génie biochimique*. Annales de Gembloux **89**: 221-237.