

Producción de proquimosina bovina recombinante en *Saccharomyces cerevisiae* utilizando cultivo incrementado

R.E. NARCIANDI, I. TORRENS, A. SANTOS, J. MORALES y L. HERRERA

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

Recibido en enero de 1991

Aprobado en mayo de 1991

RESUMEN

Se examinó el efecto de las condiciones de cultivo en la producción de la proteína fusionada SOD-proquimosina sintetizada en *Saccharomyces cerevisiae* bajo el control del fragmento corto del promotor que regula la síntesis de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

El proceso fermentativo fue realizado a nivel de 5 l y 50 l de cultivo, obteniéndose resultados similares en ambas escalas. Cuando las células son cultivadas en medio selectivo suplementado con sacarosa al 5 % e hidrolizado de caseína al 2 % utilizando un sistema batch, la concentración relativa de SOD-proquimosina es incrementada 1,7 veces, mientras que la utilización del cultivo incrementado aumenta aproximadamente cuatro veces la masa celular y eleva significativamente la producción de la proteína recombinante a un nivel del 2 % del total de la proteína celular.

SUMMARY

The effect of culture condition on SOD-prochymosin fusion protein production in *Saccharomyces cerevisiae* under the control of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase short promoter was tested.

The fermentation process was done in 5 and 50 l of fermentation culture reporting the same results. When the cells were cultured in batch using selective medium supplemented with 5 % sucrose and 2 % casein hydrolyzate, the relative mass of

SOD-prochymosin was increased 1.7 fold. The biomass was increased rather 4 fold using Fed-batch culture, and also the recombinant protein production was elevated to 2 % of total protein.

INTRODUCCION

La producción de biomateriales recombinantes utilizando las técnicas de la ingeniería genética ha sido ampliamente desarrollada en los últimos años. Han sido utilizados diferentes microorganismos con este propósito, siendo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* un buen hospedero para la producción de proteínas recombinantes, especialmente las que son utilizadas en las industrias alimentaria y farmacéutica, a causa de que es no patógena para el hombre, no produce endotoxinas y es ampliamente conocido su comportamiento a gran escala (Carty *et al.*, 1987).

Como resultado de los requerimientos específicos necesarios para el crecimiento de microorganismos recombinantes y los altos niveles de expresión de los genes clonados, ha sido necesario el desarrollo de diferentes sistemas fermentativos que

permitan la obtención de una alta concentración celular, elevada productividad y gran estabilidad genética (Fieschko *et al.*, 1987).

En los últimos años se han desarrollado investigaciones teóricas y experimentales con el objetivo de realizar el control óptimo de diferentes parámetros en los sistemas incrementados, como por ejemplo la velocidad de adición del sustrato limitante (Wu *et al.*, 1985). La utilización de este tipo de sistema fermentativo permite mantener óptimas condiciones de cultivo, ya que todos los nutrientes (fuente de carbono, nitrógeno, oxígeno molecular e iones metálicos) necesarios para el crecimiento celular, pueden ser suplementados en correspondencia con la velocidad de utilización de los mismos, lo que conduce al aumento significativo de la productividad y la reducción de los costos de operación.

Una gran variedad de productos han sido expresados en levaduras como por ejemplo el antígeno de la Hepatitis B (Kole *et al.*, 1985), antígeno de Schistosomes (Loison *et al.*, 1989), Interferón gamma (Fieschko *et al.*, 1987), incluyendo la Proquimosina bovina (Smith *et al.*, 1985).

En este trabajo se realizó un estudio relacionado con el efecto de las condiciones de cultivo en la producción de la proteína recombinante proquimosina bovina sintetizada en *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes sistemas de fermentación.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de levaduras y plasmidios

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas fueron:

- SEY 2202 (α , leu 2-3, leu 2-112, ura 3-52, his 4-519).

- BJ 2 (α , pep 4-3, prb 1-1122, leu 2, trp 1, ura 3).
- SJRY (a, ura 3, leu 2, his 4).

Las cepas fueron transformadas con el plasmidio PYQ-60 descrito previamente (Torrens *et al.*, 1990).

Reactivos

Los componentes de los medios de cultivo (peptona, extracto de levadura e hidrolizado de caseína) provienen de la OXOID (R.U.); los demás reactivos utilizados son de grado analítico.

Los medios utilizados fueron:

Medio selectivo: G.O. (Galzy y Slonimski, 1957) suplementado.

Medio complejo: YPS (10 g/l extracto de levaduras, 20 g/l peptona bacteriológica, 20 g/l sacarosa).

Condiciones de crecimiento

Cultivo batch

Las células fueron inoculadas utilizando una relación 1/10 (V/V) en 500 ml de medio G.O. suplementado con sacarosa al 2 % e hidrolizado ácido de caseína al 1 %. El cultivo fue crecido en zaranda (modelo G-25 New Brunswick Scientific Co., INC, EE.UU.) a una temperatura de 30°C y 250 rpm de agitación.

En la fase de crecimiento exponencial el cultivo es transferido a fermentadores (B.E. Marubishi, Japón) conteniendo 5 l de medio de cultivo de diferentes composiciones. Los ensayos fueron realizados durante 34 horas a 30°C, 350 rpm, 1 vvm y el pH fue mantenido en $5,0 \pm 0,1$ por adición de NaOH 2N y H₃PO₄ 2N.

Cultivo incrementado

Utilizando las condiciones descritas anteriormente fueron inoculados 4 l de sales G.O. suplementadas con sacarosa al

3 % e hidrolizado ácido de caseína al 2 %, según el caso. Una vez que la concentración de glucosa remanente en el cultivo se encontraba aproximadamente en 2 g/l, fue adicionada de forma dosificada una solución conteniendo sacarosa o mezcla de sacarosa e hidrolizado ácido de caseína. Para todos los casos la concentración final utilizada fue 5 % de sacarosa y 2 % de hidrolizado ácido de caseína. El cultivo fue mantenido durante 34 horas.

Técnicas

La masa celular seca fue determinada centrifugando 1 ml del cultivo en un tubo previamente tarado seguido por secado a 80°C hasta obtener peso constante; la glucosa presente en el medio de cultivo fue cuantificada mediante el método del D.N.S.A. (Sumner y Somers, 1949) y el por ciento de expresión de la proquimosina producida fue estimado mediante la técnica de inmunodot (Gershoni *et al.*, 1983).

La concentración relativa fue determinada dividiendo el valor obtenido en cada experimento con el valor reportado con la cepa SJRY.

RESULTADOS Y DISCUSION

Influencia de la cepa hospedera en la producción de proquimosina

Las cepas SEY 2202, BJ 2 y SJRY de *Saccharomyces cerevisiae* fueron transformadas con el plásmido PYQ-60 y la producción de proquimosina fue examinada a nivel de zaranda en medio G.O. suplementado con hidrolizado ácido de caseína al 1% y sacarosa al 2%.

Como muestra la tabla 1, el nivel de expresión obtenido (2% del total de la proteína celular) es similar en las diferentes cepas utilizadas y comparable a los niveles de expresión de proteínas heterólogas producidas en *Saccharomyces cerevisiae* (King *et al.*, 1989), como por ejemplo Interferón Alfa (1%) (Tuite *et al.*, 1982) e Interferón Gamma (1-2%) (Derynk *et al.*, 1983).

La mayor concentración de proquimosina fue obtenida al utilizar la cepa SEY 2202, lo cual es debido fundamentalmente a un mayor crecimiento celular obtenido en su cultivo.

Tabla 1
EFECTO DE LA CEPA HOSPEDERA SOBRE LA PRODUCCION
DE LA PROQUIMOSINA RECOMBINANTE

Cepas	Masa celular (g/l)	Expresión (%)	Concentración relativa de proquimosina
SEY 2202	2,1	2,0	1,25
BJ 2	1,8	2,0	1,06
SJRY	1,5	2,0	1,00

Nota: Los cultivos fueron realizados a nivel de zaranda utilizando medio G.O. suplementado con hidrolizado ácido de caseína (1%) y sacarosa (2%).

Condiciones: tiempo 48 horas, temperatura 30°C, agitación 250 rpm.

La proteína heteróloga fue expresada de forma monomérica, inactiva y asociada al debris celular con un peso molecular aproximado de 46 kDa, lo cual fue demostrado anteriormente mediante Western Blot (Narciandi *et al.*, 1991).

Influencia de la fuente de carbono

Es conocido que la presencia de altas concentraciones de azúcar en un cultivo trae como consecuencia la represión de la vía oxidativa (Efecto Crabtree), lo cual provoca que el etanol sea producido a altas concentraciones y el rendimiento celular disminuya, mientras que si el incremento de la fuente de carbono no es suficiente, no se logra la máxima producción de la masa celular (Wu *et al.*, 1985).

Con el objetivo de evaluar el efecto del nivel de la fuente de carbono utilizada (sacarosa) en la producción de la proquimosina recombinante, así como en el crecimiento celular, se realizó un ensayo a

nivel de zaranda utilizando medio G.O. suplementado con hidrolizado ácido de caseína (1%) y concentraciones desde 10 g/l hasta 50 g/l de sacarosa como fuente de carbono. Los resultados obtenidos son graficados en la figura 1, donde se observa que al aumentar la fuente de carbono la masa celular es incrementada hasta 3,2 g/l, evidenciándose que en estas condiciones no se afecta significativamente el crecimiento celular, mientras que el nivel de proteína expresada se mantiene aproximadamente constante (figura 1).

Efecto del medio de cultivo

Como se muestra en la tabla 2, cuando la cepa SEY 2202 fue crecida en sistema *batch* utilizando medio selectivo G.O., la masa celular aumentó de 2,1 a 4,2 g/l, debido al aumento en el nivel de la fuente de carbono utilizada, mientras la utilización de hidrolizado ácido de caseína (2%) en el medio de cultivo conduce a una

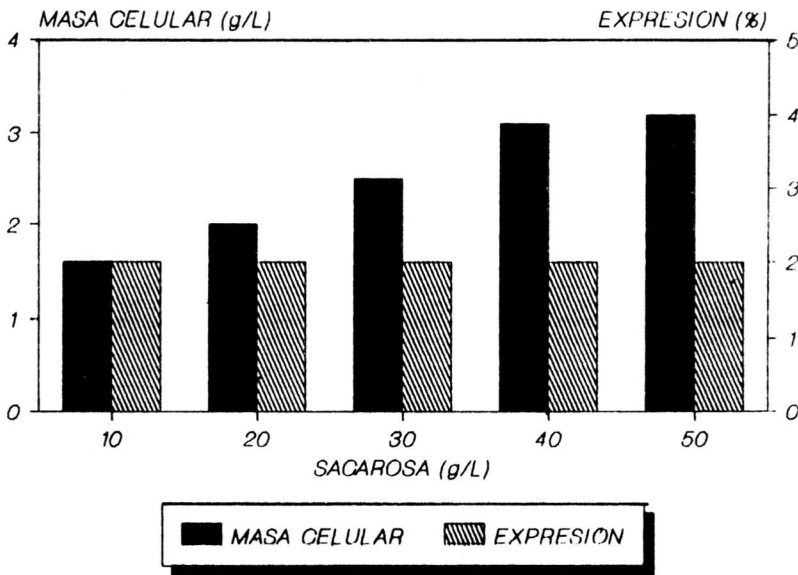


FIG. 1. Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de la proquimosina bovina y el crecimiento celular. Abscisa: Masa celular (g/l); Expresión (%). Ordenada: Concentración de sacarosa (g/l).

Tabla 2
EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO CELULAR Y LA PRODUCCION DE PROQUIMOSINA BOVINA

Medio	Masa celular (g/l)	Concentración relativa de proquimosina
GO Sacarosa 2% Leucina Histidina	2,1	1,25
GO Sacarosa 5% H.C. 1%	3,8	1,8
GO Sacarosa 5% H.C. 2%	4,2	2,15
YPS	5,0	2,3

estimulación del crecimiento celular, lo cual se corresponde con lo reportado por otros autores (Fieschko *et al.*, 1987), y también eleva la concentración relativa de la proteína de interés en 1,7 veces.

Al utilizar el medio de cultivo YPS, a pesar de que la masa celular aumenta hasta 5 g/l, no se observa una elevación significativa de la cantidad de proquimosina producida; esto puede ser atribuido a una pérdida del plasmidio durante el cultivo con motivo de la baja estabilidad que presentan los vectores seleccionados por Ura-3 cuando los transformantes son crecidos por varias generaciones en medio no selectivo (Ernst, 1986).

Producción de proquimosina utilizando sistema incrementado

La optimización de procesos fermentativos incrementados ha sido tradicionalmente dirigida a la velocidad de adición del sustrato, lo cual constituye una

variable de control natural (Carty *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 1985), ya que la velocidad a que los nutrientes son añadidos al cultivo afecta la actividad y producción de las enzimas celulares y el rendimiento celular (Fraenkel, 1982; Chen y Chiger, 1985).

Con vistas a elevar la producción de la proquimosina, fue desarrollado un sistema fermentativo en forma de cultivo incrementado utilizando dos variantes en cuanto a la composición de la solución dosificada. La velocidad de adición del medio incrementado fue ajustada para mantener la concentración de glucosa remanente en el medio de cultivo por debajo de 2 g/l. Las fermentaciones fueron realizadas como se describe en Materiales y Métodos.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos, observándose que el por ciento de proquimosina expresada permanece constante, independientemente del sistema de cultivo utilizado.

TABLA 3
 PRODUCCION DE PROQUIMOSINA EN LA CEPA SEY 2202 UTILIZANDO SISTEMAS
 DE FERMENTACION *BATCH* E INCREMENTADO

Sistema	Solución Incrementada	Masa celular (g/l)	Expresión (%)	Concentración relativa de proquimosina
A	NO	4,2	2	2,15
B	SACAROSA 2%	12,5	2	7,20
C	SACAROSA 2% H.C. 2%	17,0	2	14,60

Nota:

A: Sistema *batch* (medio G.O., sacarosa (5%), hidrolizado ácido de caseína (2%).

B: Sistema incrementado (variante 1).

C: Sistema incrementado (variante 2).

La utilización del sistema incrementado aumenta 2,9 veces la masa celular obtenida cuando solamente es adicionada la fuente de carbono de forma dosificada, mientras que al adicionar, unido a esta, una fuente de nitrógeno amínico (hidrolizado ácido de caseína a una concentración final del 2%), la masa celular es incrementada en 4 veces corroborándose la influencia del mismo en el rendimiento celular (Fieschko *et al.*, 1987). La utilización de esta variante aporta un aumento en la concentración relativa de proquimosina de 6,79 veces,

comparado con el sistema *batch*, lo cual es debido a que las condiciones de crecimiento favorecen la inducción del promotor.

Producción de la proquimosina bovina a nivel de 50 l de cultivo

El proceso fue escalado utilizando las mismas condiciones que en 5 l de cultivo.

En la figura 2 son mostradas algunas características del proceso escalado, observándose que durante la fase inicial de crecimiento el nivel de proquimosina

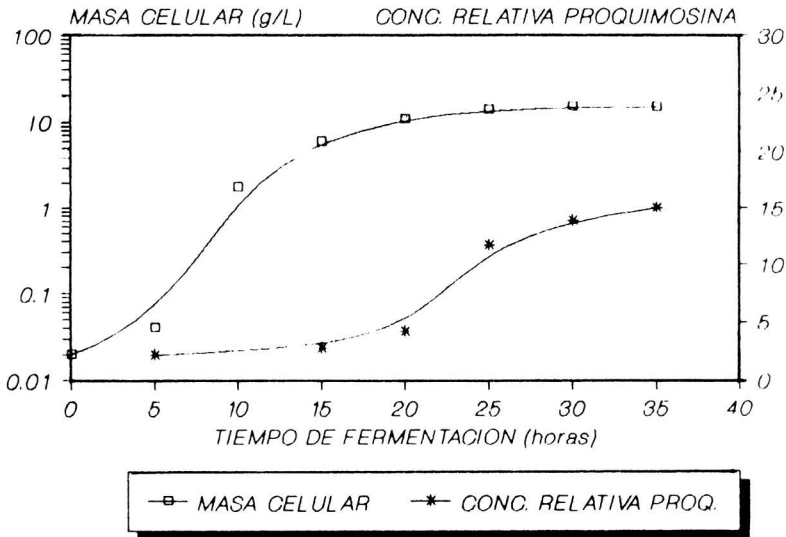


FIG. 2. Producción de la proquimosina recombinante a nivel de 50 l de cultivo.

producida es relativamente bajo, incrementándose a partir de las 15 horas de cultivo, lo que coincide con el tiempo de fermentación durante el cual el nivel de glucosa residual en el medio de cultivo se encuentra alrededor de 1 g/l.

Los mayores niveles de la proteína heteróloga son alcanzados aproximadamente a las 34 horas de crecimiento.

CONCLUSIONES

La utilización del sistema de cultivo incrementado en la producción de proquimosina recombinante trae como consecuencia un aumento en la masa celular, eleva la productividad, disminuye significativamente los costos de operación y brinda mayor reproducibilidad del sistema, ya que aumenta las posibilidades de control del mismo.

REFERENCIAS

- CARTY, C.E.; E.X. KOVACH; W.J. McALEER y R.Z. MAIGETTER (1987). Fermentation of recombinant yeast producing Hepatitis B surface antigen. *J. Industrial Microbiology* 2: 117-121.
- CHEN, S.I. y M. CHIGER (1985). "Production of baker's yeast". In: *Comprehensive Biotechnology*. Blanch, H.W.; S. Drew and D.I.C. Wang, eds. Pergamon Press, New York.3: 429-462.
- DERYNK, R.; A. SINGH y D.V. GOEDEL (1983). Expression of the human interferon γ cDNA in yeast. *Nucl. Acids Res.* 11: 1819-1837.
- ERNST, J.F. (1986). Improved Secretion of heterologous proteins by *Saccharomyces cerevisiae*: Effects of promoter substitution in alpha-factor fusions *D.N.A.* 5: 483-491.
- FIESCHKO, J.C.; K.M. EGAN; T. RITCH; R.A. KOSKI; M. JONES y G.A. BITTER (1987). Controlled expression and purification of human immune interferon from high-cell-density fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 29: 1113-1121.
- FRAENKEL, D.G. (1982). "Carbohydrate metabolism". In: *The Molecular Biology of the yeast Saccharomyces*. Strathern, J.N.; E.W. Jones and J.R. Broach. eds. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2: 1-37.
- GALZY, P. y SLONIMSKI, P.P. (1957). Variation physiologique de la levure as course de la croissance sur L'acide Lactique comme seule source de carbone. *Comptes. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 245: 2423-2433.
- GERSHONI, J.M. y G.E. PALADE (1983). Protein blotting: Principles and applications. *Anal. Biochem.* 131: 1-15.
- KING, D.J.; E.F. WALTON y G.T. YARRANTON (1989). "The production of proteins and peptides from *Saccharomyces cerevisiae*". In: *Molecular and Cell Biology of Yeast*. eds. E.F. Walton and G.T. Yarranton: 107-133.
- KOLE, M.M.; B.G. THOMPSON y D.F. GERSON (1985). Ammonium concentration control in fed-batch fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.* 63: 121-125.
- LOISON, G.; A. VIDAL; A. FINDELIA; C. ROITSCH; J.M. BALLOUL y Y. LEMOINE (1989). High level of expression of a protective antigen of schistosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 5: 497-507.
- NARCIANDI, R.E.; E. RODRIGUEZ; I. TORRENS; A. SANTOS; J. MORALES y L. HERRERA (1991). Solubilización y renaturalización de la fusión superóxido dismutasa humana y proquimosina de ternero sintetizada en *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotecnología Aplicada* 8: (en prensa).
- SMITH, R.A.; M.J. DUNCAN y D.T. MOIR (1985). Heterologous protein secretion from yeast. *Science.* 299: 1219-1224.
- SUMNER, J.V. y G.F. SOMERS (1949). "Dinitrosalicylic method for glucose". In: *Laboratory of Biological Chemistry*, 2nd ed. Academic Press, Inc, New York: 38-39.
- TORRENS, I.; A. VILLEGAS; R.E. NARCIANDI; A. SANTOS; E. RODRIQUEZ; J. MORALES; A. SILVA y L. HERRERA (1990). La fusión de los genes superóxido dismutasa humana y la proquimosina de ternero se expresa eficientemente en *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotecnología Aplicada.* 7: 257-264.
- TUITE, M.F.; M.J. DOBSON; N.A. ROBERTS; R.M. KING; D.C. BURKE; S.M. KINGSMAN y A.J. KINGSMAN (1982). Regulated high efficiency expression of human interferon-alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 1: 603-608.
- WU, W.T.; K.C. CHEN y H.W. CHIOU (1985). On-line optimal control for fed-batch culture of baker's yeast production. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 756-760.