

PRODUCCION A ESCALA PILOTO DE SACAROSA INVERTASA EN *Hansenula polymorpha*

Emilio Narciandi, Luis Rodríguez, Efraín Rodríguez, Raúl Díaz, Julio Delgado, Luis Herrera

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 6162, Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido en febrero de 1992. Aprobado en octubre de 1992.

Key words: Sucrose-invertase, *Hansenula polymorpha*, AOX promoter.

SUMMARY

The Suc II gene from *Saccharomyces cerevisiae* coding for the enzyme sucrose-invertase was cloned in *Hansenula polymorpha* under the control of the alcohol-oxidase (AOX) promoter of *Pichia pastoris*.

The culture conditions for the sucrose-invertase production using a fed-batch culture were studied, a significant relationship between the combination of the carbon sources used in the culture media and the invertase yield was obtained. The inductor (methanol) concentration used in the production step did not affect the level of expression of the protein.

The fermentative process was scaled up to 50 l. Sucrose invertase was found to be secreted to cellular periplasma at a concentration of 1 g/l of culture.

RESUMEN

El gen Suc II procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica para la enzima sacarosa invertasa, se clonó en una cepa de *Hansenula polymorpha* bajo el control del promotor alcohol oxidasa (AOX) de *Pichia pastoris*.

Se estudiaron las condiciones de cultivo para la producción de sacarosa-invertasa utilizando cultivo incrementado, obteniéndose una relación directa entre la combinación de la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo y la producción de la enzima recombinante, mientras que la concentración del inductor (metanol) utilizado en la fase de producción de la proteína de interés no afectó el nivel de expresión obtenido.

Se realizó el escalado del proceso fermentativo hasta 50 l de cultivo, obteniéndose la proteína excretada hacia el periplasma celular a una concentración de 1 g/l de cultivo.

INTRODUCCION

Las levaduras *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* han sido descritas recientemente como hospederos eficientes para expresar genes heterólogos a altos niveles utilizando el promotor alcohol oxidasa regulado por metanol (Brunt, 1986; Cregg *et al.*, 1987; Srekrishna *et al.*, 1987). Este sistema se caracteriza por los altos niveles de expresión (Ellis *et al.*, 1985; Srekrishna *et al.*, 1989) y por métodos de fermentación escalables, ya que disminuye el riesgo de contaminación, brinda alta

densidad celular (Wegner, 1983) y gran concentración de producto (Digan *et al.*, 1989), por lo que presenta un relativo bajo costo. Además, la fisiología de crecimiento de las levaduras metilotróficas ha sido estudiada extensivamente en décadas pasadas.

La enzima invertasa ha sido expresada en diferentes organismos tales como *Saccharomyces cerevisiae* (Esmon *et al.*, 1987; Tammi *et al.*, 1987) y *Pichia pastoris* (Tschopp *et al.*, 1987).

En este trabajo presentamos la optimización de las condiciones de cultivo para las células de *Hansenula polymorpha* que producen altos niveles de invertasa (1 g/l) mediante un proceso de cultivo incrementado y el escalado del mismo a diferentes niveles.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de levadura y plasmidio

Se utilizó la levadura *Hansenula polymorpha* (Ura 3) donada por C.P. Hollenberg (Institut für Mikrobiologie, University of Düsserdolf). Esta cepa fue transformada con los siguientes plasmidios:

- pIARS (Amp, tet, Lac Z, IARS), donado por C.P. Hollenberg.

- pAS24 (Amp, tet, Ura 3, HARS), que contiene el promotor AOX, la secuencia Suc 2, la secuencia de replicación (HARS) de *Hansenula polymorpha* y la secuencia para YIp 5 (resultados no publicados).

Condiciones de cultivo

La composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento del microorganismo se muestra en la tabla 1. La solución de vitaminas (pantotenato de calcio 4 mg, ácido nicotínico 1 mg, tiamina 4 mg, piridoxina 4 mg, biotina 0.4 mg) y sales trazas utilizadas (Cregg *et al.*, 1987), fueron esterilizadas separadamente por filtración. Los componentes de los medios de cultivo utilizados son de calidad analítica.

Las células de levaduras almacenadas en glicerol a -70°C fueron transferidas a 5 ml de medio de inóculo (tabla 1, medio 1) conteniendo 10 g/l de glucosa como única fuente de carbono. El cultivo se realizó a 37°C con agitación a 250 rpm en zaranda

Tabla 1
Medios de cultivo (composición para 1 l)

Compuestos	Medio 1	Medio 2
KH ₂ PO ₄	1 g	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g	4 g
KCL	-	0.5 g
MgSO ₄	0.5 g	0.5 g
CaCL ₂	0.1 g	0.1 g
Sales trazas (200X)	5 ml	5 ml
Vitaminas	10 ml	10 ml
Hidrolizado de caseína	10 g	-
NaCL	0.1 g	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	6 g	-

Nota:

Medio 1: medio de inóculo Medio 2: medio de producción

(Modelo G-25, New Brunswick Scientific Co, INC, E.U.) y el pH fue ajustado a 5.5 antes de esterilizar. En la fase de crecimiento exponencial el cultivo se transfirió a un erlenmeyer que contenía 50 ml del mismo medio y creció en las condiciones expuestas anteriormente.

Cultivo en zaranda

Se realizó inoculando las células crecidas anteriormente en medio de producción (tabla 1, medio 2), suplementado con 2% de glicerol y 2% de azúcares reductores provenientes de mieles finales, a una masa celular inicial de 0.3 g/l. Los erlenmeyers fueron colocados a 37°C, con agitación a 250 rpm durante 24 horas. El cultivo se centrifugó a 5000 x g durante 30 minutos y las células se lavaron 2 veces con agua destilada estéril, posteriormente se resuspendieron en el medio de producción suplementado con 1% de metanol (peso/volumen), añadiéndose posteriormente de forma intermitente cada 24 horas.

Cultivo incrementado en fermentadores

En la fase de crecimiento exponencial el cultivo utilizado como inóculo se transfirió al medio de producción suplementado con 2% de glicerol industrial y 2% de sacarosa (medio A) o 2% de glicerol industrial y 2% de azúcares reductores proveniente de mieles finales (medio B). El cultivo se colocó a 37°C con agitación a 350 rpm y aereación de 1 vvm, hasta obtener 50 g/l de biomasa húmeda, seguidamente se realizó un shock de metanol adicionando 1% (peso/volumen) y posteriormente se comenzó la adición continua de metanol a un flujo de 2 ó 4 g/l.h hasta el final del proceso. A las 50 horas de cultivo se adicionó 5 ml/l de sales trazas. El pH fue ajustado y mantenido durante todo

el tiempo de fermentación a 5.5 ± 0.1 con la adición de NaOH (40%). Se utilizaron fermentadores de 1,5 l y 50 l de volumen efectivo (B.E. Marubishi, Japón).

Métodos analíticos

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó mediante el método descrito por Laemmli (1970). El crecimiento fue monitoreado mediante la determinación de la masa celular (g/l de peso húmedo). El procedimiento de ruptura se realizó según lo descrito por Sreerishna *et al.*, (1989) y la actividad invertasa fue medida según el método descrito por Montesino *et al.*, (1992).

La actividad invertasa reportada en el periplasma celular fue determinada por diferencia entre la actividad presente en el medio de cultivo y la actividad determinada en el cultivo celular. Los análisis de significación se realizaron según el método "t de Student" ($\alpha = 0.02$). Los valores reportados son el resultado de las medias de 3 experimentos independientes con 2 réplicas cada uno.

RESULTADOS Y DISCUSION

Optimización de las condiciones de cultivo

Influencia del medio de cultivo y la concentración de metanol en la producción de invertasa

Como ha sido reportado anteriormente, las concentraciones elevadas de metanol no sólo causan una disminución en la obtención de biomasa, sino que reducen la producción de las proteínas recombinantes que son expresadas bajo el promotor AXO (Duff y Murray, 1988 ; Tani *et al.*, 1988).

Con vistas a evitar lo anterior, se diseñó un sistema para la producción de invertasa que consta de 2 etapas sucesivas. En la primera etapa de crecimiento se utilizó un cultivo en medio mínimo (tabla 1, medio 2) suplementado con una combinación de fuentes de carbono (ver Materiales y Métodos). Una vez consumida la fuente de carbono, se comenzó la fase de producción, caracterizada por la adición rápida de 1% de metanol (peso/volumen) seguido por la adición continua del metanol durante todo el proceso fermentativo. En esta etapa la velocidad de adición del metanol es crítica, ya que las células son muy sensibles a su acumulación.

Como se observa en la figura 1, la utilización de una combinación de 2% de azúcares reductores proveniente de miel final y 2% de glicerol como fuente de carbono en la etapa de crecimiento del cultivo (medio B), presenta una influencia significativa en la producción de invertasa, lo que debe ser causado por la composición de la miel final utilizada, rica en microelementos y vitaminas que son constituyentes necesarios para la producción de proteínas recombinantes obtenidas mediante este sistema de expresión (Cregg *et al.*, 1987).

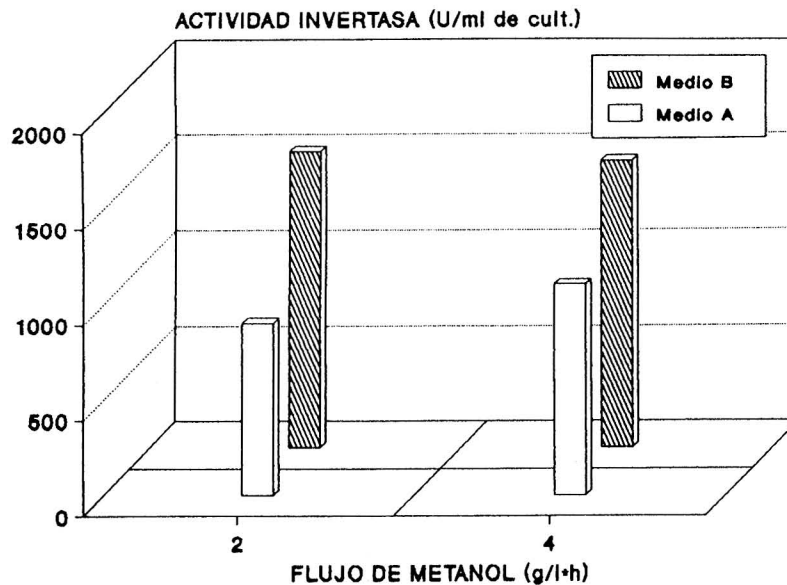


Fig. 1. Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de sacarosa invertasa. Los cultivos fueron realizados utilizando un fermentador de 1.5 l de volumen efectivo. Las condiciones de crecimiento fueron: pH 5.5 ± 0.1 , agitación 350 r.p.m., temperatura 37°C , aereación 1 v.v.m., tiempo de fermentación 150 horas.

Medio A: medio de producción suplementado con sacarosa 2% y glicerol 2%.

Medio B: medio de producción suplementado con reductores de miel final 2% y glicerol 2%.

En ambos casos la inducción fue realizada adicionando 1% de metanol (peso/volumen) y posteriormente añadiendo metanol a flujo continuo según el caso.

Al utilizar concentraciones de metanol entre 2 y 4 g/l.h no se observó un aumento significativo en cuanto a la producción de la proteína recombinante; sin embargo al aumentar la concentración del metanol se produjo una ligera inhibición del crecimiento celular, por lo que se escogió el flujo de metanol de 2 g/l.h como única fuente de carbono durante la etapa de producción. Utilizando estas condiciones la proteína recombinante es expresada a altos niveles, obteniéndose 1500 U/ml de cultivo, representando un incremento en más de 10 veces la producción de invertasa obtenida en *Saccharomyces cerevisiae* (Taussig y Carlson, 1983).

Localización de la proteína

Como se demuestra en la tabla 2, la actividad invertasa determinada en el periplasma celular es más de 2 órdenes de magnitud por encima de la actividad obtenida en el medio intracelular y extracelular, por lo que se demuestra que la mayoría de la invertasa producida (1 g/l) fue excretada hacia el espacio periplasmático de la levadura *Hansenula polymorpha*. Se han reportado diferentes resultados al expresar la enzima utilizando como hospedero la levadura *Pichia pastoris*, donde la mayoría de

la invertasa obtenida (2,5 g/l) fue excretada totalmente al medio de cultivo (Tschopp *et al.*, 1987).

Cinética de expresión y crecimiento

En la figura 2 se muestra un proceso típico de fermentación a nivel de 1.5 l utilizando un cultivo incrementado. Se observa que existe una alta producción de biomasa durante la primera etapa de crecimiento, mientras que a partir de la inducción con metanol sólo ocurre un ligero aumento. La actividad enzimática aumenta aproximadamente hasta las 90 horas de cultivo y posteriormente comienza a disminuir, por lo que se determinó detener el proceso fermentativo al cabo de este tiempo, siendo el mismo

Tabla 2

Localización de la sacarosa-invertasa	
Localización	Actividad invertasa [U/ml de cultivo $\times 10^3$]
Medio extracelular	0.012
Periplasma	1.500
Medio Intracelular	0.002

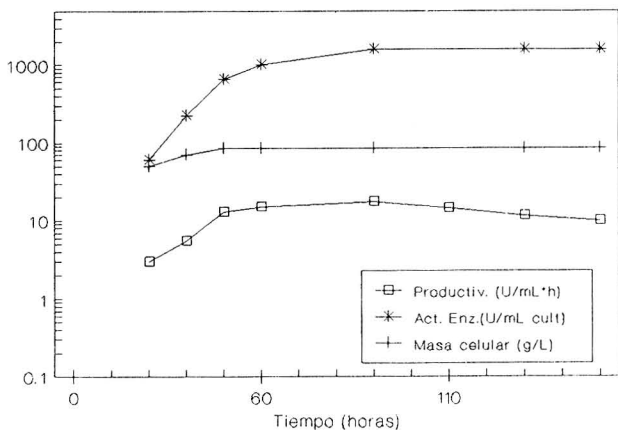


Fig. 2. Curva típica de producción de sacarosa invertasa. El cultivo se realizó a nivel de 1.5 l utilizando medio B. Condiciones: 37°C, 350 rpm, 1 vvm. La inducción fue efectuada adicionando 1% de metanol (peso/volumen) y posteriormente añadiendo metanol a un flujo de 2 g/l.h de forma continua.

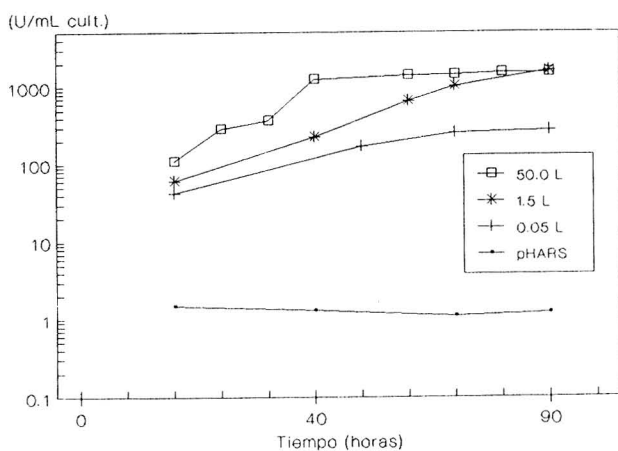


Fig. 3. Producción de sacarosa invertasa a diferentes niveles. La actividad enzimática (U de Invertasa/ml de cultivo) fue determinada a las muestras tomadas a los diferentes tiempos de cultivo. Los detalles de los procesos fermentativos se describen en Materiales y Métodos.

significativamente menor que el reportado para la producción de proteínas heterólogas utilizando cultivo incrementado de levaduras metilotróficas el cual asciende a más de 200 horas de cultivo (Cregg *et al.*, 1987 ; Tschopp *et al.*, 1987 ; Sreckrishna *et al.*, 1989).

Producción de invertasa a diferentes niveles

La cinética de expresión de la invertasa llevada a cabo a diferentes volúmenes se muestra en la figura 3. Existe poca diferencia en la cinética de síntesis de la proteína

cuando el proceso se efectúa en zaranda (0.05l) y en 1.5 l, aunque a nivel de zaranda se produce 4 veces menos invertasa debido, fundamentalmente, al bajo nivel de aereación que es posible lograr en estas condiciones, ya que se ha reportado que debe existir más del 30% de saturación del oxígeno disuelto en el medio para permitir la expresión de proteínas recombinantes en levaduras metilotróficas (Duff y Murray, 1988).

En todos los casos se observó que en el momento de inducción existía un alto nivel de actividad invertasa, lo que demuestra que la producción de la proteína recombinante se comenzó antes de la inducción por metanol producto de la derrepresión del sistema de inducción cuando se utiliza glicerol y reductores proveniente de mieles finales como fuente de carbono (Giuseppin *et al.*, 1988).

En fermentaciones efectuadas en volúmenes de 1.5 l y 50 l se alcanzan a las 90 horas de cultivo aproximadamente 1500 U/ml de Invertasa (1 g/l), demostrándose así la eficiencia del proceso de escalado. Al realizar el cultivo de las mismas células transformadas con el plasmidio pHARS (control negativo) en condiciones similares, se obtuvo menos de 2 U/ml de invertasa, evidenciándose la inducción del sistema de expresión.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

La proteína expresada en *Hansenula polymorpha* se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (figura 4); se observó un tamaño molecular aproximado

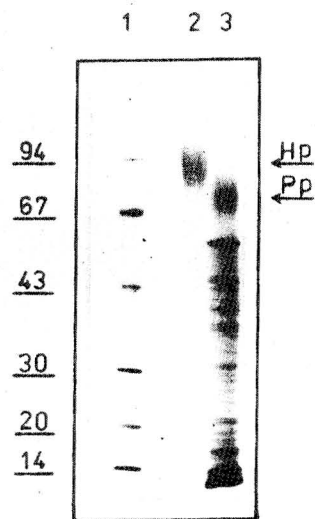


Fig. 4 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la sacarosa invertasa.

Línea 1: patrones de pesos moleculares (kDa).

Línea 2: invertasa expresada en *Hansenula polymorpha*.

Línea 3: invertasa expresada en *Pichia pastoris*.

de 90 kDa. La proteína se encuentra glicosilada a un mayor nivel que la obtenida en *Pichia pastoris* (80 kDa).

CONCLUSIONES

El cultivo de *Hansenula polymorpha* realizado a nivel piloto (50 l) utilizando como fuentes de carbono una mezcla de 2% de glicerol y 2% de reductores provenientes de miel final en la etapa de crecimiento y metanol a un flujo de 2 g/l.h en la etapa de producción, presenta un rendimiento de más de 1500 U/ml de invertasa. La mayoría de la proteína es excretada hacia el espacio periplasmático, lo que brinda la posibilidad de utilizar esta biomasa altamente productiva en sistemas de células inmobilizadas que son ampliamente utilizados en la actualidad con diferentes fines.

AGRADECIMIENTOS:

En la realización de este trabajo queremos agradecer la generosa colaboración del Dr. José Cremata y del Técnico Orlando Fuentes por su asistencia técnica en el laboratorio.

REFERENCIAS

- BRUNT, J.V. (1986). Fungi: The perfect hosts. *Biotechnology* 4: 1057-1062.
- CREGG, J.M.; F. TSCHOPP; C. STILLMAN; R. SIEGEL; M. AKONG; W.S. CRAIG; R.G. BUCKHOLZ; K.R. MADDEN; P.A. KELLARIS; G.R. DAVIS; B.L. SMILEY; J. CRUZE; R. TORREGROSSA; G. VELICELEBI y G.P. THILL (1987). High-level expression and efficient assembly of Hepatitis B Surface Antigen in the Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 5: 479-485.
- DIGAN, M.E.; S.V. LAIR; R.A. BRIERLY; R.S. SIEGEL; M.E. WILLIAMS; S.B. ELLIS; P.A. KELLARIS; S.A. PROVOW; W.S. CRAIG; G. VELICELEBI; M.M. HARPOLD; G.P. THILL (1989). Continuous production of a novel Lysozyme via secretion from the yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 7: 160-164.
- DUFF, S.J.B. y W.D. MURRAY (1988). Production and Application of Methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 31: 44-49.
- ELLIS, S.B.; P.F. BRUST; P.J. KOUTZ; A.F. WATERS; M. HARPOLD y T.R. GINGERAS (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulable genes from the Yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 5: 1111-1121.
- ESMON, P.C.; B.E. ESMON; I.E. SCHAUER; A. TAYLOR y R. SCHEKMAN (1987). Structure, assembly and secretion of octameric Invertase. *Biol. Chem.* 262: 4387-4394.
- GIUSEPPIN, M.L.F.; H.M.J. van EIJK; C. VERDUYN; I. BANTE y J.P. van DIJKEN (1988). Production of catalase-free alcohol oxidase by *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 14-19.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- MONTESINO, R.; J. CREMATA; L. RODRIGUEZ; J. DELGADO (1992). Low level of glycosylation of Invertase secreted by Methylophilic Yeast *H. polymorpha*. *Biotechnology Aplicada* 9: 22-30.
- SREEKRISHNA, K.; J.F. TSCHOPP y M. FUKU (1987). Invertase gene (SUC 2) of *Saccharomyces cerevisiae* as a dominant marker for transformation of *Pichia pastoris*. *Gene* 59: 115-125.
- SREEKRISHNA, K.; L. NELLES; R. POTENZ; J. CRUZE; P. MAZZAFERRO; W. FISH; M. FUKU; K. HOLDEN; D. PHELPS; P. WOODS y K. PARKER (1989). High-level expression, Purification and Characterization of recombinant Human Tumor Necrosis Factor Synthesized in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* 28: 4117-4125.
- TAMMI, M.; L. BALLOU; A. TAYLOR y C.E. BALLOU (1987). Effect of glycosylation on yeast Invertase oligomer stability. *J. Biol. Chem.* 262: 4395-4401.
- TANI, Y.; W.J. LIM y H.C. YANG (1988). Isolation of L-Methionine-enriched mutant of a Methylophilic Yeast, *Candida boidinii* No 2201. *J. Ferment. Technol.* 66: 153-158.
- TAUSSING, R. y M. CARLSON (1983). Nucleotide sequence of the yeast SUC 2 gene for Invertase. *Nucl. Acids. Res.* 11: 1943-1954.
- TSCHOPP, J.F.; G. SVERLOW; R. KOSSON; W. CRAIG y L. GRINNA (1987). High-level secretion of glycosylated Invertase in the Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 5: 1305-1308.
- WEGNER, E.H. (1983). Biochemical conversions by yeast fermentation at high-cell densities. U.S. patent 4414329.