

ESTRATEGIA DE ESCALADO PARA LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE α -AMILASA

Mario Canales, Eduardo Ramos y Antonio Enríquez

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado Postal 6162, C.P. 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.

Introducción

La enzima α amilasa ha sido expresada eficientemente en la levadura *Pichia pastoris* (1, 2). En nuestro Centro se ha desarrollado una tecnología para su obtención (3). En este trabajo se expone la estrategia seguida en el escalado de la producción y la secuencia de procesos *scale up /scale down* realizada para llegar a un esquema productivo económicamente factible.

Materiales y Métodos

Cepa

Se utilizó la cepa MPA 3625 en la cual fue clonado el gen que expresa la enzima α -amilasa recombinante.

Medios de cultivo

Para la etapa de propagación se utilizó un medio salino suplementado, con glucosa como fuente de carbono. Durante la etapa de producción se utilizó un medio que contiene sales de amonio, urea y miel final de caña, hasta una concentración de azúcares reductores de 60 g/L como fuente de carbono. La expresión se indujo por adición de metanol.

Determinaciones de azúcares reductores

Fueron realizadas utilizando el método descrito por Miller (4).

Determinaciones de actividad enzimática

Se utilizó el mismo método empleado por Margolles, et al. (1).

Recobrado de la enzima

Los procesos de cosecha de biomasa se efectuaron en centrifugas de pomos a 10 300 xg a pequeña escala y en centrifugas de discos a 10 600 xg para la escala piloto. La filtración se realizó en un filtro prensa de 0,8 m² de superficie filtrante y la concentración en un rotoevaporador al vacío a 50 °C.

Resultados y Discusión

Se optimizó un esquema de fermentación en 5 L de volumen efectivo, que fue escalado hasta 200 L, en el que se logró obtener 1 000 uAE/mL (2,1 g/L de enzima) en 80 h de fermentación, con una productividad de 12,5 uAE/L h y un consumo de metanol de 1,82 mL/L de cultivo. Se diseñó a partir de los resultados una secuencia de pasos de recobrado de

la enzima que incluyeron: la separación de la biomasa por centrifugación, la filtración del crudo enzimático y su concentración en un rotoevaporador al vacío. Se establecieron las operaciones en planta piloto y se obtuvieron los índices fundamentales de pérdidas de cada operación que permitieron diseñar y evaluar económicamente la tecnología propuesta a diferentes capacidades.

La Figura 1 muestra la influencia que sobre el costo de producción y el plazo de recuperación de la inversión tiene la capacidad de producción elegida. Para capacidades inferiores a 5 000 t/año, el costo de producción es mayor que la ganancia, para un precio estimado de la enzima de 3 000 \$/t. Como consecuencia los plazos de recuperación de la inversión son superiores a los 4 años, aumentando hasta 17 cuando la capacidad disminuye a 1 000 t anuales.

Del estudio de la demanda en nuestro país se estimó una capacidad necesaria para la planta entre 1 000 y 2 000 t anuales. Se analizó la tecnología propuesta y se concluyó que el proceso limitante era la fermentación, y que por ello el porcentaje de utilización del equipamiento de recobrado era bajo. Se

1. Margolles E, et al. *Biotecnología Aplicada* 1992;9:38-47.

2. Paifer E, et al. *Yeast* 1994;10:1415-1419.

3. Chico E. Trabajo de Diploma 1992.

4. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959;31:426-428.

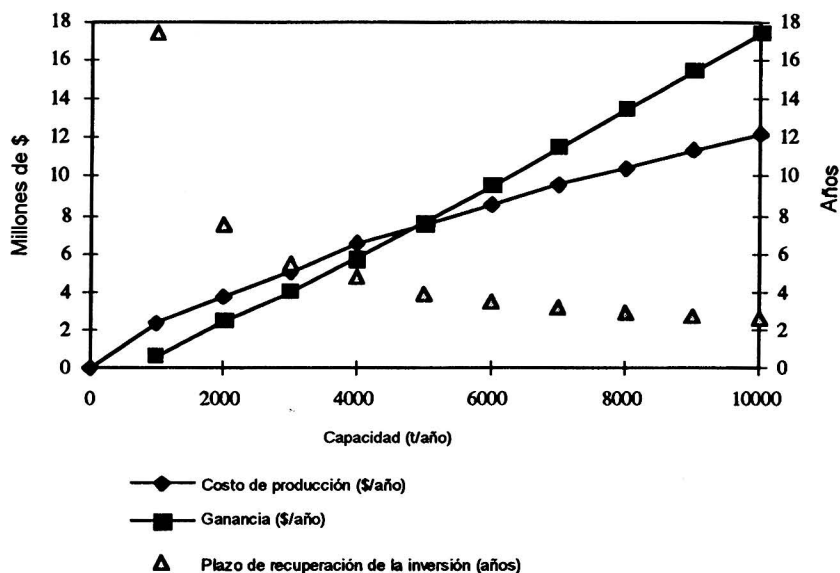


Figura 1. Costo de producción, ganancia económica y plazo de recuperación de la inversión contra capacidad de producción para la tecnología inicial.

hizo un *scale down* del proceso fermentativo y se desarrolló un esquema de fermentación semicontinua en el que se redujo el tiempo de fermentación a 40 h, con el mismo nivel de expresión de la proteína. (Figura 2). A partir de este resultado una nueva evaluación de la tecnología para una planta de 2 000 t/año mostró plazos de recuperación de la inversión de 3 años.

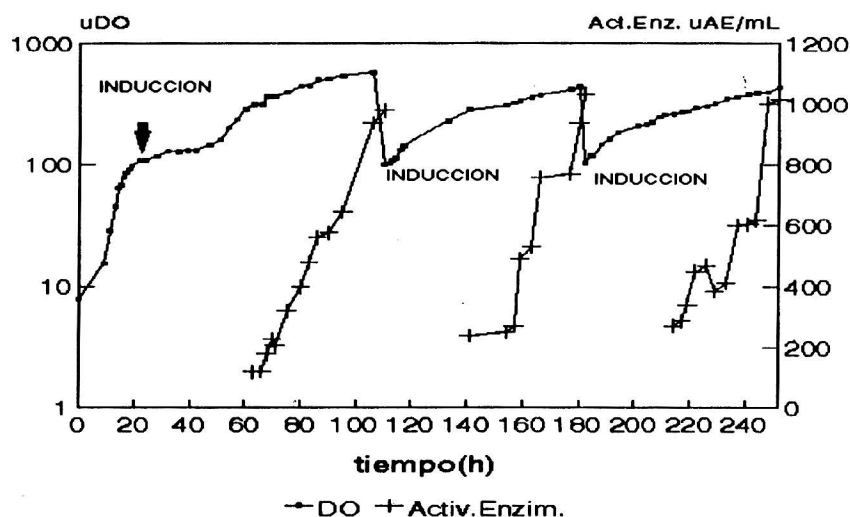


Figura 2. Proceso de fermentación semicontinua, en el que disminuyó el tiempo de fermentación a 40 h.

MOLECULAR GENETICS AND BIOTECHNOLOGY OF METHYLOTROPHIC YEASTS

Cornelis P Hollenberg

Institute for Microbiology, Heinrich-Heine-University Duesseldorf,
Universitaetsstr. 1, D 40225 Duesseldorf, Germany.

In recent years an number of yeast species other than *Saccharomyces cerevisiae* have become accessible for molecular genetics and thereby for potential application in biotechnology. In this respect the methylotrophic yeasts, *Hansenula polymorpha* and *Pichia stipitis* have already been proven to offer significant advantages over *S. cerevisiae* for the production of certain heterologous proteins. The methylotrophic yeasts share general pathways to assimilate and catabolize methanol. Growth on methanol is accompanied by a strong induction of peroxisomes and enzymes involved in methanol metabolism. The strong inducible promoters of the corresponding genes are used for the expression of heterologous genes.

To improve the use of these promoters we have analyzed in great detail the regulation of the MOX promoter of the gene encoding methanol oxidase. We have found methods to circumvent the tight glucose repression of this promoter. In *S. cerevisiae* the MOX promoter can mediate a glucose repressible expression of a fused lac Z gene. This repression was mediated by MOX-B, a 240 bp promoter region which is also involved in catabolite

repression in *H. polymorpha*. The negative regulation mediated by MOX-B was counteracted by Adr 1p, a transcription factor which has been shown to be involved in the derepression of ADH2 and, most remarkably, of genes encoding peroxisomal proteins. Details of the binding of Adr 1p to the MOX promoter and its action will be discussed.

During Mox derepression, two different transcripts have been detected starting in the MOX promoter at -25 and -425, from which the smaller transcript accounts for the translation of methanol oxidase. Several small ORFs in the leader sequence of the larger transcript prevent efficient translation. A model for the function of the strong Mox promoter, involving the Adr 1p homologue and a coordinated switch between the two transcription points will be presented.

Finally the suitability of *H. polymorpha* for application in biotechnology will be demonstrated by the discussion of promising developments of pharmaceutical proteins such as the production of hirudin and hepatitis B L- and S-antigenes. Moreover the use of recombinant *H. polymorpha* for bioconversion will be presented.