

DIFERENTES ESTRATEGIAS DE ADICIÓN DEL SUSTRATO A LOS CULTIVOS DE *Pichia pastoris* RECOMBINANTE

Efraín Rodríguez Jiménez, Kosara Sánchez, Hernán Roca y Julio Delgado

División de Bioindustria, CIGB, apartado postal 6162, Ciudad de La Habana, Cuba.

Introducción

La industria azucarera no se ubica entre las ocho primeras en la aplicación de las enzimas industriales (1), debido fundamentalmente al elevado precio de las enzimas aplicables en ella motivado por sus altos costos de producción. El uso de las técnicas de recombinación, así como la aplicación de las tecnologías y sistemas de fermentación bien ajustados, disminuyen considerablemente los costos y facilitan obtener procesos de alto rendimiento (2-5). En este trabajo se muestra la influencia que ejerce la estrategia utilizada de adición del sustrato inductor sobre el crecimiento celular y la secreción de la enzima recombinante dextranasa, donde los máximos alcanzados fueron de 320 y 5 g/L de cultivo, respectivamente.

Parte experimental

Para el estudio se utilizó la cepa de *Pichia pastoris* recombinante con el gen que codifica para la dextranasa. Se trabajó en medio industrial que contiene 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 6,8 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8,3 mM de Urea y agua amoniacal 25 % como tibrante. La fuente de carbono inicial en los cultivos y para los inóculos fue 4 % de reductores libres aportados por la miel final de caña clarificada. Las fermentaciones se realizaron a escala de 1,5 L con 1 vvm, 350 rpm, a pH inicial de 5,5 y 30 °C. Al agotarse los reductores libre, el pH se fijó a 5,2, se incrementó la agitación a 750 rpm y se adicionó 1 % de MeOH. Al aparecer la respuesta metabólica del cultivo al nuevo sustrato, se comenzó la dosificación de 2 g de MeOH/Lh. Se analizaron tres estrategias de variación del flujo de adición de MeOH en la segunda fase (de producción).

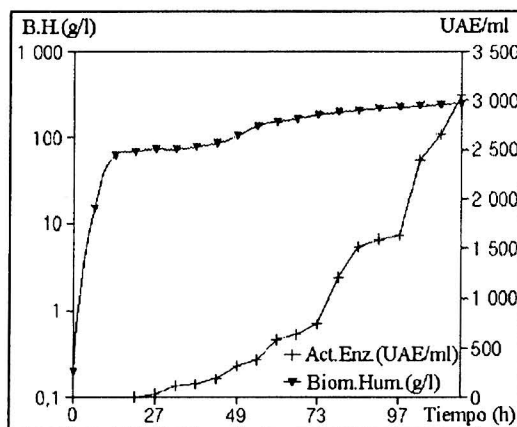
a. El flujo del MeOH se incrementó en 0,5 g/Lh por cada 50 g de incremento ocurrido en la biomasa húmeda del cultivo.

b. El flujo de incremento se siguió por el factor K_i , donde $f_{(\text{MeOH})} = \text{BH} / K_i$.

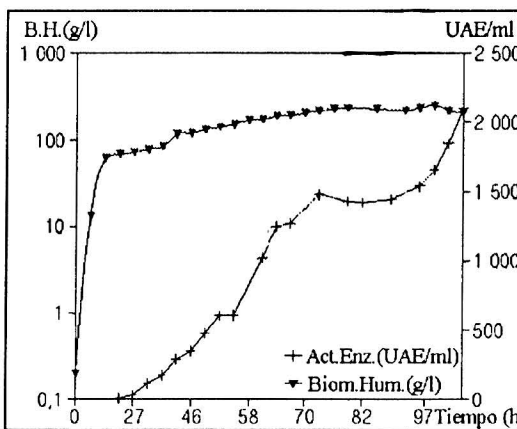
c. El flujo de MeOH se aumentó en función del oxígeno disuelto de forma tal que la tendencia de éste fuera a disminuir y se mantuviera entre 15 y 20 %.

Resultados y Discusión

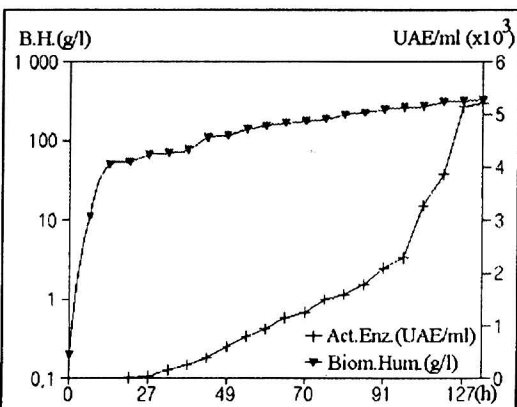
Como se puede apreciar en la Figura 1, en el caso (a), el crecimiento en metanol mantuvo un comportamiento estable, con una μ promedio de $0,013 \text{ h}^{-1}$



A



B



C

Figura 1. Curvas de crecimiento y secreción de enzima: (a-c) en correspondencia con la estrategia utilizada.

1. EA Falch. Industrial Enzymes-Developments in Production and Application. *Biotechnology Advances* 1991;9(4):643-658.

2. Modak JM and Lim HC. Simple Non-singular Control Approach to Fed Batch Fermentation Optimization. *Biotechnology and Bioengineering* 1989;33:11-15.

3. Agrawal P, Koshy G and Ramseier M. An Algorithm for Operating a Fed Batch Fermentor at Optimum Specific-Growth Rate. *Biotechnology and Bioengineering* 1989;33:115-125.

4. Suárez-Cortez R, Álvarez-Gallegos J and González-Mora. E Sliding Controller Design for a Nonlinear Fermentation System. *Biotechnology and Bioengineering* 1989;33:377-385.

5. Andrews G. Estimating Cell and Product Yields. *Biotechnology and Bioengineering* 1989;33:256-265.

pero la secreción de enzima sólo mostró aumentos considerables, inmediatamente después de cada incremento del flujo. En el caso (b) sin embargo, la μ en intervalos tomó valores próximos a $0,03 \text{ h}^{-1}$ apareada a una alta secreción de la enzima, pero cuando el flujo de incremento llegó a $4,3 \text{ g/Lh}$, ambas se inhibieron debido a la toxicidad del metanol y a la

incapacidad para ser degradado éste a la concentración alcanzada por la acumulación. Finalmente, en el caso (c), el comportamiento del crecimiento fue estable, con una μ de $0,016 \text{ h}^{-1}$ al igual que el de la secreción enzimática, la cual llegó a alcanzar el valor extraordinario de 5 g/L . En la Tabla 1 se aprecian algunos datos sobre el rendimiento de estos cultivos.

Tabla 1. Algunos indicadores de los cultivos (a-c) en correspondencia con la estrategia utilizada.

Indicadores de rendimiento	(a)	(b)	(c)
Biomasa húmeda/sustrato (g BH/g MeOH)	0,739	0,469	0,889
Producto/sustrato (UAE x 10^3 /g MeOH)	10,27	4,95	12,66

IPK
INSTITUTO
PEDRO KOURÍ

SOCIEDAD
LATINOAMERICANA DE
MEDICINA TROPICAL

V Congreso Latinoamericano
de Medicina Tropical
V Congreso Cubano de
Microbiología y Parasitología
II Congreso Cubano
de Medicina Tropical
Congreso 60 Aniversario
del IPK

3 al 7 de Marzo de 1997

Ciudad de La Habana,
Cuba



Comité Organizador V CLAMT
Instituto "Pedro Kourí"
Apartado 601
Marianao 13
Ciudad de La Habana, Cuba.

Teléfono: (53-7) 21 5957
Fax: (53-7) 21 5957 y 33 6051

Simposios:

- Dengue hemorrágico
- Control de vectores
- SIDA en las Américas
- Infecciones respiratorias agudas
- Enfermedades diarreicas agudas
- Zoonosis
- Malacología médica
- Oncocercosis y schistosomiasis
- Malaria
- Cólera
- Tuberculosis
- Enfermedades de transmisión sexual
- Vacunas: avances y perspectivas
- Meningitis meningocócica
- Hepatitis B
- Interferones y citokinas
- Cuidados de enfermería en VIH/SIDA
- Educación posgraduada
- Bioseguridad
- Tecnología médica: Aplicaciones del sistema Diramic™ en la detección rápida de la sepsis urinaria y el antibiograma

Cursos Pre-Congreso:

- Vigilancia epidemiológica de enfermedades infecciosas y parasitarias
- Control integral de vectores
- SIDA: Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos
- Diagnóstico de enfermedades transmisibles por métodos de biología molecular
- Dengue en la Américas
- Sistema de información geográfica aplicados a la epidemiología de enfermedades transmisibles
- Cólera en las Américas
- Micosis en pacientes VIH/SIDA
- Manejo de enfermería del paciente VIH/SIDA
- Actualización en el diagnóstico, tratamiento y control de tuberculosis
- Avances en el diagnóstico parasitológico
- Malaria
- Malacología médica
- Bioseguridad en los laboratorios