



Universitat Autònoma de Barcelona

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria

Departament d'Enginyeria Química

**PRODUCCIÓN DE LA LIPASA LIP2 DE *Candida*
rugosa EN EL SISTEMA *Pichia pastoris*:
CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN EN
REACCIONES DE SÍNTESIS**

Programa de Doctorado en Biotecnología

Tesis para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona

Manuel Rubén Alarcón Vivero

Bellaterra, junio de 2008

El Dr. Francisco Valero Barranco, la Dra. M^a Dolors Benaiges Massa y el Dr. Pau Ferrer Alegre, profesores del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICAMOS:

Que el biólogo Manuel Rubén Alarcón Vivero ha realizado, bajo nuestra dirección, en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, el trabajo titulado **“Producción de la lipasa Lip2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: Caracterización y aplicación en reacciones de síntesis”** que se presenta en esta memoria, constituyendo su Tesis para optar al grado de doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Para su conocimiento y para los efectos que se consideren oportunos, presentamos ante la Escola Tècnica Superior d'Enginyeria (ETSE) y la Escola de Postgrau de la Universitat Autònoma de Barcelona la nombrada Tesis, firmando esta certificación en Bellaterra, mayo de 2008.

Dr. Francisco Valero
Barranco

Dra. M^a Dolors Benaiges
Massa

Dr. Pau Ferrer
Alegre

A mis seres queridos que en su infinito amor me dan la libertad para hacer las cosas que me gustan, gracias Nelly y gracias Nicolas

Agradecimientos

Al iniciar el doctorado nunca pensé encontrar tan buenos amigos y compañeros de trabajo, personas que en los momentos difíciles de mi vida han conseguido hacerme reír, gracias y muchas gracias a todas las personas del departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona, que de una u otra forma participaron en el desarrollo de este trabajo, tanto discutiendo de ciencias como dándome su solidaridad y apoyo personal.

Mis primeros agradecimientos especiales, a mis directores de trabajo a los cuales les agradezco su gran paciencia, confianza y apoyo, muchas gracias Paco, Dolors y Pau.

Agradecimiento especial para mi familia que siempre me apoyó aunque sin saber de qué se trataba este viaje, desde que lo inicié entrando a estudiar Biología en la Universidad de Concepción-Chile, hasta ahora en la Universitat Autònoma de Barcelona, a mi madre Nieves, gracias por tu amor y tu apoyo, a mis hermanos Leonardo, Marco y José Luis, su gran apoyo en todo momento ha sido muy importante, a Claudia, Fernando y Feñaña una familia escogida, una gran amistad, siempre han estado aquí.

A mis seres queridos que siempre han estado conmigo y han tenido que soportar con amor y paciencia mis desilusiones y mis depresiones cuando los experimentos no resultaban, su apoyo ha sido el pilar principal para construir este proyecto de vida, gracias Nelly y gracias Nicolás.

Mis agradecimientos se extienden a mis compañeros de grupo Anna Ubach, Anna Surribas, Cristín, Oriol, Ramón y David, gracias por ese sorprendente y gran compañerismo, y por supuesto a los jefes Paco, Dolors, José Luis y Pau siempre los llevare en mis recuerdos, para ello me llevo las fotos.

A los compañeros de laboratorio en el departamento, a toda gente de los distintos grupos MABs, Melissa, Aldolasas, Gases, Aguas, y a los compañeros de despacho con los cuales me la he pasado súper bien, trabajando duro y también divirtiéndome muchísimo. A todo ese gran personal administrativo Montse y Nati. A los de los laboratorios Manuel, Rosi, Vanesa, Lorena, Óscar muchas gracias siempre los he

sentido muy cercanos, en fin a todos que si los números y agradezco en forma puntual tendría que escribir otra tesis.

Un hermoso recuerdo es mi estancia en Ourense-Galicia el laboratorio dirigido por la Dra. Marisa Rúa, muchas gracias por vuestra simpatía, alegría y la gran disposición a ayudar, me sentí muy cómodo entre ustedes, vuestro recuerdo estará siempre en mi “os galegos sonche xente moi especial”.

He de agradecer a mis amigos y vecinos de Ripollet, a José Luis cuanto amor y cuantas botellas, muchas gracias; a M^a Angeles y Manolo, a Pepi y Jordi, a Montse Matas habéis sido los primeros en recibirnos con los brazos abiertos y sin conocernos, a Lali y Antonio vuestro apoyo y las risas son una constante, a Lola y José siempre preocupados de contar con nosotros, a Pedro y Lorena grandes personas con un gran corazón, a Marga, Jordi y Lorena pequeña musa inspiradora, a Mónica y Pere, vuestra simpatía siempre presente, permitieron salidas de vampiros que pertenecen a los anales de mis farras, a Francesca y Sergi vuestra dulzura es un constante recuerdo, a Amara y Dani vuestra simpatía y espontaneidad es agradecida especialmente por mi espalda, a la Pili y al Jordi cuanto nos hemos reído y llorado muchas gracias por vuestro constante apoyo. A ustedes grandes personas os agradezco por que sois una parte importante de este trabajo, habéis sido nuestra familia nunca los olvidaré, nunca los olvidaremos, muchísimas gracias hermanos. En fin a todo Can Tiana-Pont Vell vuestro apoyo ha sido inmenso las gratas discusiones merengues-blau granas me llevan a pensar que la paz mundial es posible.

También van mis agradecimientos al CONICYT-Chile que mediante la beca CONICYT-BID me han permitido el desarrollo de este doctorado y al Ministerio de Ciencia y Tecnología Español por la financiación concedida bajo el proyecto PPQ 2001-1908 “Optimización del sistema de producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*: aplicación a la producción de lipasas y proteínas terapéuticas” y el proyecto CICYT CTQ2004-00300 "Sistema integrado de producción de proteínas heterólogas en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* /para la obtención de productos de interés farmacéutico y veterinario".

Agraïments

A l'iniciar el doctorat mai vaig pensar que em trobaria amb tan bons amics i companys de feina, persones que en els moments difícils de la meva vida han aconseguit fer-me riure. Moltes gràcies a totes les persones del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, que d'una manera o altra forma han participat en el desenvolupament d'aquest treball, tant discutint sobre ciències com donant-me la seva solidaritat i suport personal.

Els primers agraïments més especials, als meus directors de feina, als quals els agraeixo la seva gran paciència, confiança i suport. Moltes gràcies Paco, Dolors y Pau.

Agraïments especials per la meva família que sempre m'ha recolzat tot i saber que es tractava d'aquest viatge, des de que el vaig iniciar entrant a estudiar Biologia a la Universidad de Concepción-Chile, fins ara a la Universitat Autònoma de Barcelona. A la meva mare Nieves, gràcies pel teu amor i el teu suport, als meus germans Leonardo, Marco y José Luís, el seu gran recolzament en tot moment ha sigut molt important, a la Claudia, en Fernando y la Feñaña una família escollida, una gran amistat, sempre han estat aquí.

Als meus éssers estimats que sempre han estat amb mi i han hagut d'aguantar amb amor i paciència les meves desil·lusions i depressions quan els experiments no sortien, el seu recolzament ha estat el principal pilar per construir aquest projecte de vida, gràcies Nelly y gràcies Nicolás.

Els meus agraïments s'estenen als meus companys de grup Anna Ubach, Anna Surribas, Cristín, Oriol, Ramón y David, gràcies per aquest sorprenent i gran companyerisme, i per descomptat als directors Paco, Dolors, José Luis y Pau sempre els portaré en els meus records, per això m'emporto les fotos.

Als companys de laboratori en el departament, a tota la gent dels diferents grups: MABs, Melissa, Aldolases, Gasos, Aigües, i als companys de despatx amb qui he m'ho he passat superbé; treballant fort i també divertint-me moltíssim. A tot aquest gran personal administratiu la Montse i la Nati. Als dels laboratoris en Manuel, la Rosi,

la Vanesa, la Lorena, en Oscar moltes gràcies sempre els he sentit molt pròxims. En fi, a tots, que si els enumero i agraeixo de forma puntual hauria d'escriure una altra tesis.

Un preciós record és la meva estància en Ourense-Galícia, al laboratori dirigit per la Dra. Marisa Rúa, moltes gràcies per la vostra simpatia, alegria i la gran disposició a ajudar, m'hi vaig sentir molt còmode entre vosaltres, el vostre record sempre estarà dins meu ““os galegos sonche xente moi especial””.

He d'agrair als meus amics i veïns de Ripollet. Al José Luis per l'amor i les ampolles, moltes gracies. A la M. Angeles i el Manolo, a la Pepi i el Jordi, a la Montse Matas heu estat els primers en rebre'ns amb els braços oberts i sense conèixer-nos. A la Lali i l'Antonio el vostre recolzament i les rialles són constant. A la Lola i el José sempre comptant amb nosaltres. Al Pedro i la Lorena grans persones amb un gran cor. A la Marga, el Jordi i la Lorena petita, musa inspiradora. A la Mònica i el Pere, la vostra simpatia sempre present, han permès la sortida dels vampirs que pertanyen als “anales de mis farras”. A la Francesca i el Sergi la vostra dolçor és un constant record. A l'Amara i el Dani, la vostra simpatia i espontaneïtat és agraïda especialment per la meva esquena. A la Pili i al Jordi, com hem rigut i plorat, moltes gràcies pel vostre constant suport. A vosaltres, grans persones us ho agraeixo perquè sou una part important d'aquest treball, heu sigut la nostra família, mai us oblidaré, mai us oblidarem. Moltíssimes gràcies germans. En fi, a tot Can Tiana-Pont Vell el vostre, suport ha sigut immens, les grates discussions merengue-blau grana m'han dut a pensar que la pau mundial és possible.

També van els meus agraïments al CONICYT-Chile que amb la beca CONICYT-BID m'han permès el desenvolupament d'aquest doctorat i al Ministerio de Ciencia y Tecnología Español pel finançament concedit sota el projecte PPQ 2001-1908 “Optimización del sistema de producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*: aplicación a la producción de lipasas y proteínas terapéuticas” i el projecte CICYT CTQ2004-00300 "Sistema integrado de producción de proteínas heterólogas en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* /para la obtención de productos de interés farmacéutico y veterinario".

Dedicatoria

*“Hay hombres que luchan un día
y son buenos.
Hay otros que luchan un año
y son mejores.
Hay quienes luchan muchos años
y son muy buenos.
Pero hay los que luchan toda la vida:
Esos son los imprescindibles”.*

Bertolt Brecht

Índice

1.-RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1. Las enzimas, biocatalizadores	9
2.2.- Los lípidos	9
2.3.- Lipasas: características generales	11
2.4. Reacciones catalizadas por lipasas de interés biotecnológico.....	14
2.5.- Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas	15
2.6.- Inmovilización de un biocatalizador.	17
2.7.- Factores físicos y químicos que afectan a la actividad enzimática	19
2.8.- Fuentes de lipasas	20
2.9.- Lipasas de <i>Candida rugosa</i>	22
2.10.- Estructura de los genes <i>lip</i> de <i>C. rugosa</i>	24
2.10.1. Secuencia del gen <i>lip2</i> y estructura tridimensional de Lip2.....	26
2.10.2. Análisis comparativo del producto de los genes <i>lip</i> de <i>C. rugosa</i>	28
2.11.- Purificación de las lipasas de <i>C. rugosa</i>	31
2.12.- Sistemas de expresión de proteínas heterólogas	33
2.13.- La levadura metilotrófica <i>Pichia pastoris</i>	34
2.13.1. Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas	37
2.13.2. <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión recombinante de proteínas: Base conceptual y características	38
2.13.3. Construcción de un vector de expresión en <i>Pichia pastoris</i>	41
2.13.4. Cepas de expresión	43
2.13.5. Estrategias de producción de proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i>	45
2.13.6. Proteínas expresadas en <i>Pichia pastoris</i>	46
2.14.- Producción de lipasas <i>C. rugosa</i> en forma heteróloga.....	48
2.14.1. Expresión heteróloga de <i>lip1</i>	49
2.14.2. Expresión heteróloga de <i>lip4</i>	50
2.14.3. Expresión heteróloga de <i>lip2</i>	51
2.14.4. Expresión heteróloga de <i>lip3</i>	51

3.- OBJETIVOS.....	53
3.2. Objetivo general.....	55
3.3. Objetivos parciales.....	55
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
4.1. Cepas y medios de cultivo	59
4.2. Métodos de Biología Molecular.....	61
4.2.1. Síntesis del gen <i>lip2</i> mediante PCR.....	61
4.2.2. Modificación del DNA plasmídico.....	65
4.2.3. Purificación del DNA plasmídico y fragmentos de DNA	65
4.2.4. Subclonación de <i>lip2</i> en pPICZ α y transformación de <i>P. pastoris</i>	65
4.2.5. Clonación del gen <i>lip2</i> para la expresión en <i>E. coli</i>	68
4.2.6. Producción de rLip2 en <i>E. coli</i>	68
4.2.6.1.- Purificación por gradiente de pH	69
4.2.6.2.- Purificación por gradiente de Imidazol	69
4.2.7.- Electroforesis de DNA	71
4.2.8.- Transformación de <i>E. coli</i> y <i>P. pastoris</i>	71
4.2.8.1.- Transformación de <i>E. coli</i>	71
4.2.8.2.- Transformación de <i>P. pastoris</i>	72
4.3.- Cultivos de <i>Pichia pastoris</i>	74
4.3.1. Cultivos en matraces Erlenmeyer para selección de cepas productoras de rLip2.....	74
4.3.2. Cultivos de <i>P. pastoris</i> en fermentadores.....	74
4.3.2.1.- Reactor en discontinuo.....	74
4.3.2.2.- Biorreactor discontinuo alimentado	76
4.3.2.3.- Protocolos de fermentación.....	77
4.3.2.3.1.- Pre-inóculo.....	77
4.3.2.3.2.- Inoculo.....	77
4.3.2.3.3.- Puesta en marcha del cultivo.....	78
4.3.2.3.4.- Puesta en marcha del cultivo discontinuo.....	81
4.3.2.3.5.- Puesta en marcha del cultivo discontinuo alimentado.....	83

4.4.- Análisis de las distintas variables en los procesos de fermentación	86
4.4.1.- Biomasa	86
4.4.1.1.- Biomasa mediante densidad óptica	86
4.4.1.2.- Biomasa mediante peso seco.....	86
4.4.2.- Análisis de metanol	86
4.4.3.- Análisis de glicerol.....	87
4.5.- Análisis cuantitativo y cualitativo de proteínas	88
4.5.1.- Análisis cuantitativo de proteínas.....	88
4.5.1.1.- Análisis de proteína extracelular e intracelular	88
4.5.2.- Análisis cualitativo de proteínas.....	89
4.5.2.1.- Geles de Poliacrilamida SDS-PAGE	89
4.5.2.2.- Tinción de geles SDS-PAGE	90
4.5.2.3.- Desglicosilación enzimática.....	91
4.5.3.- Detección inmunológica (Western-Blot).....	92
4.5.4.- Método colorimétrico de análisis de actividad lipásica.....	94
4.5.5.- Obtención de concentrado de proteína rLip2 y liofilizado rLip2	96
4.5.6.- Caracterización funcional de rLip2	98
4.5.6.1.- Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad lipásica.....	98
4.5.6.2.- Efecto de la temperatura sobre la actividad lipásica	98
4.5.6.3.- Efecto del pH sobre la actividad lipásica	98
4.5.6.4.- Especificidad frente a triglicéridos y p-nitrofenoles	99
4.5.6.4.1.- Especificidad frente a triglicéridos.....	99
4.5.6.4.2.- Especificidad frente a p-nitrofenoles.	101
4.5.6.5.- Estabilidad enzimática a bajas temperaturas.....	102
4.5.6.5.1.- Estabilidad enzimática a 4° C.....	103
4.5.6.5.2.- Estabilidad enzimática a-20° C	103
4.5.6.5.3.- Efecto provocado por la congelación y descongelación sucesivas sobre la actividad lipásica	103
4.6.- Estudio de la estabilidad de rLip2 en solución.....	103
4.7.- Diseño del plan Factorial.....	104
4.8.- Inmovilización de rLip2 sobre el soporte EP100.....	107
4.8.1. Estudio de la estabilidad de rlip2 inmovilizada sobre EP100.....	108

4.9.- Análisis de los enantiómeros del ibuprofeno y TPCH y sus respectivos esteres	109
4.9.1.- Análisis de los enantiómeros y esteres del ibuprofeno	109
4.9.2.- Análisis de los enantiómeros y esteres del TPCH	110
4.9.3.- Parámetros de las reacciones quirales	111
5.-RESULTADOS	113
5.1.- Síntesis y clonación del gen <i>lip2</i>	115
5.1.1.- Síntesis del gen <i>lip2</i>	115
5.1.2.- Subclonación del gen <i>lip2</i> sintético en el vector de expresión pPICZ α	119
5.1.3.- Transformación de <i>Pichia pastoris</i>	121
5.2.- Producción de rLip2 en <i>P. pastoris</i>	123
5.2.1.- Fermentaciones de <i>P. pastoris</i> a distintos pHs	124
5.2.2.- Fermentaciones de <i>Pichia pastoris</i> siguiendo una estrategia de operación discontinuo alimentado	128
5.3.- Recuperación de la actividad lipásica rLip2	135
5.3.1.- Liofilización de la proteína rLip2	140
5.4.- Caracterización bioquímica de rLip2	141
5.4.1.- Secuenciación del N-terminal de rLip2	141
5.4.2.- Análisis del grado de glicosilación	142
5.4.2.1.- Producción y purificación de rLip2 en <i>Escherichia coli</i>	143
5.5.- Caracterización funcional de rLip2	145
5.5.1.- Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad lipásica	145
5.5.2.- Efecto de la temperatura sobre la actividad lipásica	147
5.5.3.- Efecto del pH sobre la actividad lipásica	148
5.5.4.- Especificidad frente a p-nitrofenoles y triglicéridos	149
5.5.5.- Estabilidad enzimática a bajas temperaturas	153
5.5.5.1.- Estabilidad enzimática a 4° C	154
5.5.5.2.- Estabilidad enzimática a -20° C	155
5.5.5.3.- Efecto provocado por la congelación y descongelación sucesivas sobre la actividad lipásica	156
5.5.6.- Estudio comparativo de la estabilidad entre la nlip2 y rlip2	157

5.6.- Inmovilización de rLip2	161
5.6.1.- Estudio de la estabilidad de rlip2 inmovilizada sobre EP100	164
5.7.- Reacciones de síntesis de esteres enantioméricos mediante rLip2	166
5.7.1.- Síntesis de los enantiómeros del Ibuprofeno	167
5.7.2.- Síntesis de los enantiómeros de TPCH.....	168
6. CONCLUSIONES.....	171
6.1.- Conclusión global	173
6.2.- Conclusiones parciales	173
7. BIBLIOGRAFIA.....	175
7.1. Referencias	177
7.2. Bibliografía electrónica	190
8. ANEXOS.....	193
8.1- Código genético y frecuencias.....	195
8.2.- Diferentes calibrados.....	198
8.3.- Abreviaciones.....	200

1.- Resumen

Una de las aplicaciones más comunes de la Biotecnología es la producción y utilización de enzimas. Entre éstas se encuentran las lipasas, una enzima con numerosas aplicaciones en biocatálisis debido tanto a la explotación de su reacción natural, hidrólisis de enlaces éster, como su utilización en reacciones de transesterificación y síntesis orgánica. Por este motivo, las lipasas son unas enzimas muy utilizadas en un gran número de aplicaciones de muy diverso índole industrial.

Actualmente, la mayoría de las lipasas comerciales se obtienen vía fermentativa a partir de una amplia variedad de microorganismos entre los que destaca la levadura *Candida rugosa*.

Existen lipasas comerciales de este microorganismo pero tienen el inconveniente de ser una mezcla de isoenzimas. Se han identificado hasta 7 genes potencialmente codificadores de isoenzimas en *Candida rugosa*, identificándose como mínimo tres isoenzimas diferentes y en diferentes proporciones en preparados comerciales, las denominadas Lip1, Lip2 y Lip3. Esta heterogeneidad en los preparados comerciales comporta que en reacciones de síntesis química para la resolución de mezclas racémicas se obtengan variaciones importantes de enantioselectividad dependiendo del lote de origen de la enzima.

Por consiguiente, es obvio que la manera de solucionar este problema es trabajar con un preparado de la isoenzima pura. Debido a la gran homología existente entre las diferentes isoenzimas, los procesos de purificación para obtenerlas puras conllevan unos rendimientos muy bajos, inferiores al 10%, lo que hace el proceso inviable desde el punto de vista de su aplicación industrial.

La alternativa consiste en producir la isoenzima pura expresada heterológamente en otro microorganismo. No obstante, esta vía topa también con la peculiaridad de que *Candida* no posee un código genético universal para el amino ácido serina, con lo que al expresar la lipasa por las técnicas clásicas de ADN recombinante en microorganismos huéspedes, se obtiene la isoenzima no activa debido al cambio de aminoácidos serina en su secuencia. La solución pasa por la sustitución de éstos aminoácidos concretos mediante mutagénesis dirigida o la construcción del gen sintético completo, adaptado al mismo tiempo el uso de codones de todo el gen al nuevo huésped.

En el grupo de Ingeniería de Bioprocesos y Biocatálisis Aplicada del Departamento de Ingeniería Química de la UAB se lleva años trabajando en la producción y aplicación en Biocatálisis de lipasas nativas de *Candida rugosa*. Más recientemente se ha comenzado a estudiar las prestaciones de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* como sistema de

expresión de productos heterólogos. Por consiguiente, el grupo de investigación donde se ha realizado la presente tesis doctoral estaba en disposición de estudiar la producción heteróloga de una isoenzima de *C. rugosa* en el microorganismo huésped *Pichia pastoris*. En concreto se planteó la producción heteróloga de Lip2 puesto que es una isoenzima prácticamente inexistente en los preparados comerciales,

Para ello, con objeto de obtener el gen sintético, se diseñó y optimizó la secuencia nucleotídica de rLip2 para su óptima expresión en *Pichia pastoris*, su inserción en el vector de expresión pPICZ α bajo el control transcripcional del promotor de la alcohol oxidasa (AOX1), su transformación en *Pichia* y la selección de clones productores de rLip2 activa hasta niveles de producción en Erlenmeyers.

Una vez comprobada la obtención de clones productores de rLip2 funcional, el siguiente pasó fue caracterizar su producción en bioreactor. Primeramente se determinó el pH óptimo mediante estrategias de operación en discontinuo como paso previo a la optimización del bioprocesos trabajando en una estrategia de operación en discontinuo alimentado (*fed-batch*) en cultivos de elevadas densidades celulares.

Para conseguir un bioproceso lo más reproducible posible se utilizó todo el equipo de monitorización y control de bioprocesos desarrollado en otras tesis doctorales dentro del mismo grupo.

Los primeros resultados fueron decepcionantes ya que, a diferencia de la operación en discontinuo, al trabajar con fermentaciones en discontinuo alimentado no se detectó presencia de actividad lipásica. Los geles de electroforesis revelaron la presencia de proteínas de mayor peso molecular del correspondiente a rLip2, pesos moleculares múltiplos de la misma. Análisis por Western revelaron que se trataba de agregados de rLip2, sugiriendo que las formas agregadas del enzima producido no tenían actividad lipásica.

Una posible hipótesis que se planteó para justificar la formación de los agregados de rLip2 fue la elevada salinidad del medio de cultivo (alta fuerza iónica). Con el objetivo de recuperar la actividad enzimática, se diseñó un proceso de purificación consistente en la disminución de la fuerza iónica del medio mediante ultra y diafiltración. Aplicando este proceso, se consiguió detectar el monómero de rLip2 y asociado a ello la presencia de actividad lipásica. Comparándose con los valores de actividad obtenidos en la producción con el microorganismo natural, la producción del producto heterólogo fue 10 veces superior, con el inconveniente de no poder detectar y cuantificar el producto hasta el final del proceso de diafiltración.

A continuación se realizó una caracterización bioquímica preliminar y una caracterización funcional determinándose el óptimo de temperatura y pH, su especificidad frente a p-nitrofenoles y triglicéridos y su comparación con la Lip2 nativa, con lipasas comerciales que tienen una mezcla de isoenzimas y otras isoenzimas recombinantes de *Candida*.

Interesante desde el punto de vista de su aplicación industrial fue el estudio de estabilidad de la rLip2 frente a pH y temperatura, para lo que se realizó un diseño de experimentos. El estudio demostró que la enzima recombinante en solución era mucho menos estable que la nativa. No obstante, al inmovilizar la rLip2 se consiguió obtener una isoenzima mucho más estable con el valor añadido de poder ser reutilizada.

Finalmente se realizó un estudio preliminar de aplicación biocatalítica de esta isoenzima recombinante en reacciones de síntesis enantioméricas para la resolución de mezclas racémicas de compuestos de interés farmacéutico. Si bien para la resolución racémica del trans-2-fenil-1-ciclohexanol, un intermediario quiral de la industria farmacéutica la rLip2 no fue tan efectiva como la isoenzima nativa, para la resolución del ibuprofeno, un antiinflamatorio no esterooidal, se obtuvieron mejores resultados en términos de conversión, exceso y factor enantiomérico que con la nativa.

2.- Introducción

2.1.-Las enzimas, biocatalizadores

Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas siempre que sea termodinámicamente posible, por lo cual se les denomina biocatalizadores. Casi todos los procesos químicos celulares utilizan enzimas o biocatalizadores. Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación para una reacción, acelerándose substancialmente la velocidad de la reacción. Las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas, siendo su actividad afectada por agentes ambientales como la temperatura, el pH, la presión y/o agentes operacionales como la aireación. Por otro lado, la presencia de inhibidores que disminuyen la actividad enzimática, obliga a trabajar habitualmente a concentraciones de sustratos y productos bajos, lo que muchas veces provoca un encarecimiento de la etapa de purificación del producto de interés. Esto, asociado a su elevado coste y su poca estabilidad en medios y condiciones alejadas de las fisiológicamente habituales, lleva a continuos estudios para la optimización de procesos biocatalíticos.

En los últimos años, la utilización de biocatalizadores ha aumentado considerablemente al presentar importantes ventajas respecto a los procesos químicos convencionales. Son selectivas y específicas, presentan condiciones de trabajo de fácil manejo (temperatura y presión, ambiental o cercana a ellas en la mayoría de los casos, pH de fácil regulación), evitan la formación de productos secundarios típicos de procesos químicos, consiguiendo la reducción de pasos de purificación del producto deseado y la recuperación del biocatalizador, y generan menos residuos, por ejemplo, no suelen necesitar cantidades importantes de solventes orgánicos. Por todos estos motivos, actualmente, las enzimas son usadas comercialmente en un sinnúmero de aplicaciones.

2.2.- Lípidos

Los lípidos son un grupo de moléculas heterogéneas, solubles en disolventes apolares y ligeramente polares, como hexano, benceno, cloroformo, éter o metanol, e insolubles o parcialmente solubles en agua. Por esta propiedad, son las únicas sustancias biológicas que se clasifican en función de su solubilidad y no de sus características estructurales como el resto de las moléculas biológicas (proteínas, azúcares, ácidos nucleicos). De

acuerdo a la clasificación de Small (1968), se distinguen dos grupos de lípidos en función de su comportamiento en un medio acuoso: lípidos apolares y polares.

Los lípidos apolares (hidrocarburos), son totalmente insolubles en agua y no forman monocapas. No existen compuestos de este tipo que sean sustratos de las lipasas. Por su parte los lípidos polares se subdividen en tres clases: clase I, clase II y clase III.

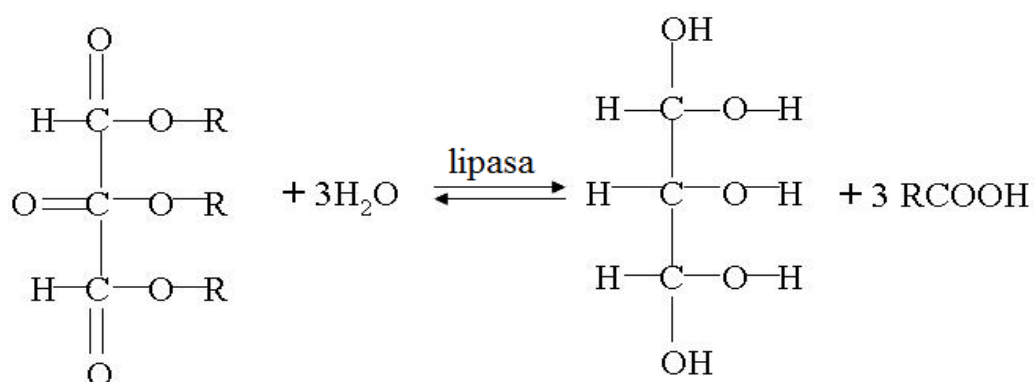
- Clase I, Incluye a aquellos lípidos que no se hinchan en contacto con el agua y forman monocapas estables, como por ejemplo los diacil- y triacilgliceroles de cadena larga, las vitaminas A, K y E y numerosos esteroides.
- Clase II, incluye a lípidos como los fosfolípidos, monoacilgliceroles y ácidos grasos que se extienden sobre la superficie del agua formando monocapas. No obstante, si se hidratan se hinchan y forman fases liotrópicas bien definidas (cristales líquidos) tales como los liposomas.
- Clase III, esta conformada por fosfolípidos, triacilgliceroles de cadena corta, sales biliares y ésteres carboxílicos del *p*-nitrofenol, son parcialmente solubles en agua, formando monocapas inestables y, por encima de su concentración micelar crítica (CMC), micelas.

Muchos estudios cinéticos enzimáticos en los que intervienen lipasas se realizan con ésteres sintéticos de cadena corta y media (ésteres carboxílicos del *p*-nitrofenol, triacetina, tripropionina, tributirina). En medio acuoso, estos ésteres pueden encontrarse como monómeros y a medida que aumenta la concentración del sustrato organizarse en micelas, monocapas o emulsiones. Muchas lipasas pueden hidrolizar el sustrato en cualquiera de los estados, lo que da idea de la complejidad de estos sistemas y la dificultad para realizar análisis cinéticos. Generalmente para caracterizar las lipasas se utilizan triglicéridos y *p*-nitrofenoles, cuya velocidad de hidrólisis permitirá cuantificar la actividad lipásica y esterásica respectivamente de la enzima en estudio.

Así como los triglicéridos son acilgliceroles, un tipo de lípidos formados por una molécula de glicerol, que tiene esterificados sus tres grupos hidroxilo por tres ácidos grasos saturados o insaturados. Los *p*-nitrofenoles, son compuestos nitrofenólicos con un ácido graso en la posición *para* con unión éster entre el ácido graso y el nitrofenol.

2.3- Lipasas: características generales.

Como se ha mencionado una de las aplicaciones más comunes de la biotecnología es la producción y utilización de enzimas. Entre estas enzimas se encuentran las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas EC. 3.1.1.3), que pertenecen a un grupo de enzimas hidrolíticas cuya función biológica es catalizar la hidrólisis de triglicéridos para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol o sus productos intermedios como mono y diglicéridos (Fig. 2.1).



Triglicérido

Glicerol

ác. graso

Fig. 2.1.- Esquema de acción de las lipasas hidrolizando un triglicérido, en donde R son ácidos grasos saturados o insaturados.

En la naturaleza, las lipasas actúan en la interfase orgánica-acuosa, y su modelo cinético normalmente no se ajusta a cinéticas del tipo Michaelis-Menten siendo generalmente mucho más complejo (Verger *et al.*, 1990). De hecho, la característica diferencial de las lipasas con respecto a otras enzimas que también pueden hidrolizar ésteres como las esterasas es la necesidad de una interfase orgánico-acuosa para dicha función catalítica.

Los substratos propios de las lipasas son ésteres insolubles, necesitando la lipasa de una interfase orgánica-acuosa para su activación. Esta activación normalmente se produce mediante un fenómeno de adsorción inicial sobre la fase orgánica-acuosa, al que sigue la reacción propiamente dicha sobre la interfase, con la formación de complejo enzima-substrato y posterior liberación de los productos a la fase acuosa con la posterior regeneración de la enzima (Jaeger *et al.*, 1994).

En el caso de la activación esterásica la situación es completamente diferente puesto que las esterasas catalizan hidrólisis de ésteres solubles, trabajando sin interfase y pudiendo

describirse su cinética mediante modelos de Michaelis-Menten. En este punto, es necesario señalar que la mayoría de lipasas son también esterases, sin embargo, no ocurre lo mismo con las esterases, que no suelen catalizar reacciones con sustratos insolubles, precisamente por la necesidad de trabajar en la interfase.

Debido a la baja solubilidad de sus sustratos, las lipasas han de ser capaces de interaccionar con la interfase de sus sustratos agregados. Así, la mayoría se caracterizan por ser activas por interfase; en otras palabras, una vez que se adsorben a una interfase desarrollan una actividad muy superior a la que muestran en la fase acuosa, fenómeno que se conoce como activación interfacial tal como se observa en la figura 2.2.

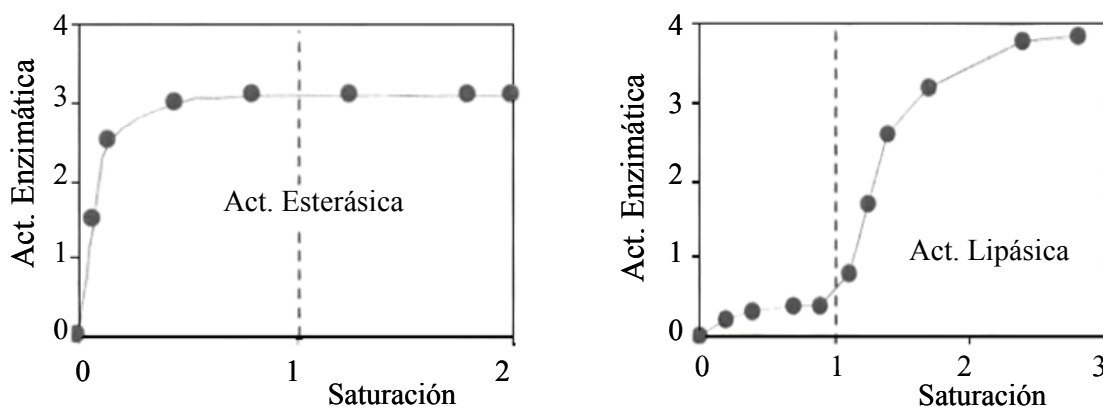


Fig. 2.2.- Esquema de actividad de las enzimas esterases y lipasas

Este fenómeno de activación interfacial de las lipasas, fue observado por Holwerda *et al.*, 1936 y por Schönheyder *et al.*, 1945, en ambos casos trabajando con la lipasa pancreática porcina. Sarda y Desnuelle (1958) purificaron esta lipasa y estudiaron con detalle el fenómeno, observando que la actividad de la lipasa sobre tríacetina aumentaba notablemente una vez que se superaba su límite de solubilidad. Se plantearon dos hipótesis, conocidas con el nombre de modelo de la enzima y modelo del sustrato.

El modelo de la enzima fue propuesto por Desnuelle *et al.*, 1960, suponiendo que la activación interfacial podría responder a un cambio conformacional sufrido por las lipasa. Esta reacción no se puede describir mediante una reacción Michaelis-Menten, ya que el proceso de hidrólisis tiene diversas etapas (Verger *et al.*, 1990).

Por lo que respecta al modelo sustrato, la activación se explicaría por la modificación del sustrato lipídico en la interfase: aumento de la concentración local del sustrato en la vecindad del centro activo, mejor orientación y conformación de los lípidos empaquetados en la interfase con respecto a la geometría del centro activo de la enzima o a la disminución del grado de hidratación del sustrato (Muderhwa *et al.*, 1992, Smaby *et al.*, 1994).

Desde principios de la década de los 90 las lipasas han levantado grandes expectativas en otras aplicaciones como son la resolución de mezclas racémicas de compuestos quirales de interés para la industria farmacéutica (Skupin *et al.*, 1997), mediante reacciones de inter y transesterificación (Jaeger *et al.*, 1994), y de síntesis de productos enantioméricos puros (Gil *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2008), así como en la síntesis de compuestos de interés en la industria de perfumería y fragancias (Dandavate *et al.*, 2008) entre otros.

Por lo que respecta a la especificidad de las lipasas está directamente relacionada con el microorganismo productor de las mismas. De acuerdo con esto, existen lipasas **no específicas**, es decir, aquéllas que hidrolizan el triglicérido en cualquiera de sus posiciones, obteniéndose como productos intermedios (1,2) (2,3) (1,3) diglicéridos y monoglicéridos. A este grupo pertenece la lipasa de *Candida rugosa* y la de *Candida curvata* (Rose y Harrison, 1989). Por lo que se refiere a lipasas **específicas** dicha especificidad puede ser de dos tipos:

- 1) **Posicional**: cuando se hidrolizan preferentemente ciertas posiciones del triglicérido, normalmente las posiciones 1 y 3 que son las más accesibles. Pertenecen a este tipo de lipasas las producidas por *Yarrowia lipolytica*, *Candida deformans*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus japonicus* y *Rhizopus delemar* (Macrae, 1983; Macrae y Hammond, 1985; Rose y Harrison, 1989).
- 2) **De ácido graso**: cuando se cataliza la hidrólisis de un determinado tipo de ácido graso particular de un triglicérido. Ejemplos de este tipo son las lipasas de *Penicillium cyclopium*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* y *Geotrichum candidum* (Borgström y Brockman, 1984; Sidebottom *et al.*, 1991).

2.4.-Reacciones catalizadas por lipasas de interés biotecnológico.

El interés de las lipasas es consecuencia de su acción específica sobre unos enlaces químicos determinados. Su reacción natural es la hidrólisis del enlace éster. Esto permite una amplia serie de aplicaciones como la resolución de compuestos quirales y la obtención, con un alto rendimiento, de ácidos grasos de elevada pureza a partir de aceites y grasas. Además, las lipasas también catalizan otras reacciones no necesariamente lipolíticas, lo que hace que estas enzimas tenga una amplia utilización en reacciones muy diversas.

Otras aplicaciones muy interesantes vienen dadas por la capacidad de estas enzimas de catalizar la reacción inversa lo que permite la síntesis de ésteres, la transesterificación y la interesterificación (Jaeger *et al.*, 1994). En estos últimos casos citados la concentración del agua en el medio será un parámetro clave para desplazar el equilibrio hacia la síntesis de los productos de interés, siendo muy comunes los sistemas de eliminación continua del agua formada durante la reacción (Kwon *et al.*, 1995).

La transesterificación se define como una reacción de síntesis en la cual el acil donador es un éster, y se distinguen dos tipos de transesterificaciones, glicerólisis y alcoholísis, según sea el glicerol o un alcohol el acil receptor. En las figura 2.3 y 2.4 se puede observar el mecanismo de la transesterificación.

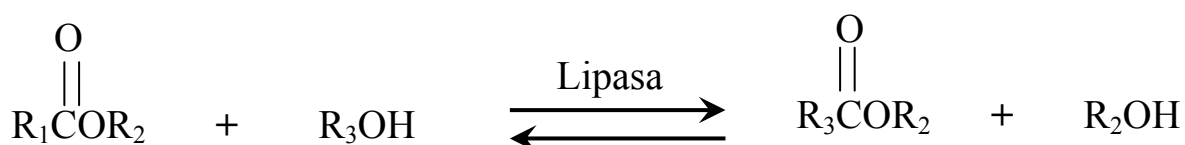


Fig. 2.3.- Esquema de transesterificación del tipo alcoholísis

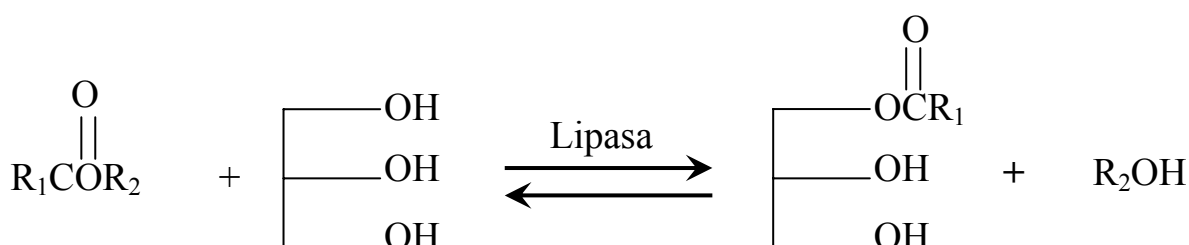


Fig. 2.4.- Esquema de transesterificación del tipo glicerólisis.

Por otro lado, la interesterificación es un proceso útil para cambiar la composición de ácidos grasos en un enlace éster, en el cual el grupo acil se intercambia entre un éster y un ácido graso (acidólisis) o entre dos ésteres como se presenta en la figura 2.5.

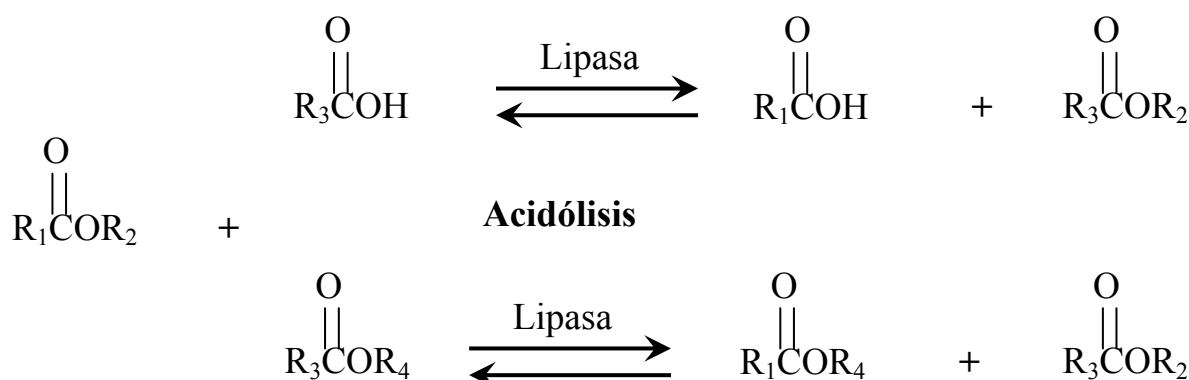


Fig. 2.5.- Esquema de interesterificación.

2.5.- Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas.

El interés biotecnológico por las lipasas se debe a su especificidad por enlaces químicos determinados, y su alta selectividad y/o estereoselectividad (López, 2001)

Las aplicaciones biotecnológicas clásicas con interés industrial de las lipasas están íntimamente ligadas a los distintos tipos de reacciones que son capaces de llevar a cabo, así pues, se tienen distintas posibilidades (Sánchez, 1998; Cos, 2005):

a) Reacciones de hidrólisis

- Hidrólisis de aceites vegetales en la industria oleoquímica.
- Producción de aromas y sabores para la industria alimentaria.
- Inclusión en detergentes para la eliminación de manchas de grasas.
- Finalidades analíticas para la determinación de la estructura de triglicéridos.
- Resolución de mezclas quirales.

b) Reacciones de síntesis:

- Síntesis de triglicéridos.
- Síntesis de precursores de péptidos.
- Producción de esteroides para la industria farmacéutica.
- Resolución de mezclas racémicas de alcoholes en la industria farmacéutica.
- Síntesis de alcoholes terpénicos como saborizantes.

- Síntesis de ésteres glucídicos para la industria cosmética.
- c) Reacciones de interesterificación:
- Variación de la composición de ácidos grasos en mezclas de triglicéridos.
 - Eliminación de ácidos grasos responsables de causar la inestabilidad en el sabor de ciertos aceites y mantequillas.
- d) Reacciones de transesterificación:
- Preparación de compuestos enantioméricamente puros.
 - Transesterificaciones enantioselectivas dobles.

Actualmente, el estudio de las lipasas se encamina a una serie de aplicaciones de química fina de interés fundamentalmente farmacéutico, básicamente en el campo de la resolución de compuestos quirales, ya que, en las normativas de legislación se tiende a exigir productos ópticamente puros en lugar de mezclas racémicas, esto está provocando un gran esfuerzo de investigación en el campo de las lipasas como biocatalizadores enantioméricamente activos. Algunos de los trabajos en los que se está haciendo hincapié son (Sánchez, 1998; Cos, 2005):

- Preparación de cicloalcanoles enantioméricamente puros como intermediarios de reacciones de interés farmacológico.
- Síntesis enantioselectiva de α -amino- β -hidroxi ácidos como productos para elucidar estructuras tridimensionales de proteínas y péptidos.
- Preparación de análogos de hormonas enantioméricamente puros.
- Preparación de enantiómeros puros del ácido 2-aril-propiónico, como ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno entre otros, de utilidad farmacológica como antiinflamatorios.
- Síntesis altamente diastereoselectiva de β -Lactonas como intermediarios para la producción de compuestos quirales.
- Producción de agentes antipsicóticos como derivados de butirofenonas enantioméricamente puros.
- Síntesis de piranonas ópticamente puras, útiles en ciertas reacciones quirales como adiciones cíclicas.
- Resolución cinética de alcoholes secundarios.

- Preparación de quinonas diterpenoides útiles en el tratamiento de artritis.
- Producción de biosurfactantes como ácido araquidónico de aplicación en la industria de alimentación, cosmética y farmacéutica.
- Preparación de etanolaminas ópticamente activas de interés fisiológico en medicina.

Uno de los principales productores mundiales de lipasas es la empresa Novo Nordisk, que presenta numerosas líneas de productos que se diferencian según la aplicación final y por ende en la especificidad de la enzima.

Dado todo lo anterior no solo existe la necesidad de producir lipasas bien caracterizadas en base a su bioquímica y sistemas de almacenamientos adecuados, sino también su purificación e inmovilización para poder ponerlas en contacto con los sustratos de interés para las diferentes reacciones.

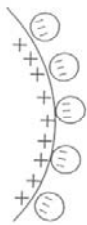
2.6.- Inmovilización de un biocatalizador.

La inmovilización de un biocatalizador, consiste en su localización en una región definida de espacio, manteniendo al mismo tiempo una actividad catalítica deseada. La inmovilización de biocatalizadores presenta una serie de ventajas, tales como su reutilización o la utilización en procesos en continuo. Esto permite mejoras en la separación entre el producto y el biocatalizador, además de la posibilidad de aumentar significativamente la concentración de biocatalizador, con respecto a un proceso en que se encuentre en suspensión, el aumento de la estabilidad de los biocatalizadores y su resistencia a la desnaturalización y proteólisis. Estas ventajas suelen generar un aumento de la productividad, lo que suele desembocar en un sistema económicamente más rentable. A pesar de las ventajas señaladas, encontramos desventajas tales como que se añade una etapa en la preparación de la enzima, que puede afectar negativamente la actividad catalítica, dado que los fenómenos de difusión pueden limitar la velocidad de reacción.

En síntesis, la necesidad de inmovilizar una enzima vendrá condicionada por el sistema de reacción que se requiera emplear.

Los principales métodos de inmovilización de biocatalizadores se pueden resumir en cinco grupos (Godia *et al.*, 1998) (Fig. 2.6):

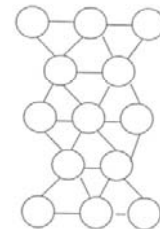
- ✓ Adsorción: la inmovilización se produce por interacción de tipo iónico o fuerzas de atracción débiles, sobre la superficie del soporte.
- ✓ Enlace covalente: la inmovilización también se realiza sobre la superficie de un soporte, pero la interacción entre el biocatalizador y el soporte es mediante enlace covalente.
- ✓ Enlaces cruzados y autoinmovilización: en este grupo no existe soporte propiamente como tal. Las partículas del biocatalizador inmovilizado se logran mediante interacción directa, por enlace covalente.
- ✓ Atrapamiento: formación de una estructura tridimensional, en presencia del biocatalizador, que queda atrapado de forma uniforme en su interior.
- ✓ Sistemas con membranas (microencapsulación, membranas preformadas). En ambos casos el biocatalizador se inmoviliza en el interior de un espacio limitado por una membrana. En el primer caso las microcápsulas se producen en presencia del biocatalizador, que queda incorporado en su interior. En el segundo caso, el biocatalizador se introduce en el interior de un sistema con membranas previamente formadas.



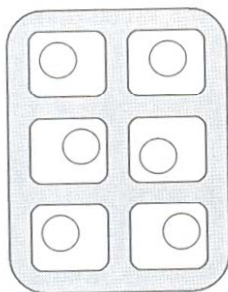
Adsorción



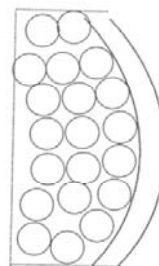
Enlace covalente



Enlaces cruzados



Inclusión



Retención por membranas

Fig. 2.6.- Esquemas de los distintos métodos de inmovilización de biocatalizadores, adaptado de (Godia *et al.*, 1998.)

La inmovilización por adsorción fue el primer método que se desarrolló y seguramente es el más simple de todos. Consiste en poner en contacto una solución acuosa de la enzima con un adsorbente activo, y después de un tiempo, una vez efectuada la adsorción, lavar el soporte formado para eliminar cualquier cantidad de biocatalizador que no se haya inmovilizado. Las interacciones que favorecen la adsorción son de tipo iónico, y también otras formas de enlace débil, como puentes de hidrógeno o fuerzas de van der Waals. La adsorción de enzimas se ha estudiado sobre una gran variedad de soportes de distinta naturaleza (tanto de carácter orgánico como inorgánico) y estructura física, y en muchos casos con pre-tratamientos para favorecer la inmovilización.

De forma general se puede decir que la adsorción es un método de inmovilización muy suave, y que por tanto no suele afectar la actividad de las enzimas. El problema más importante que presenta es su reversibilidad, dado que a menudo cambios en el pH, fuerza iónica o temperatura pueden provocar la desadsorción del soporte.

2.7.- Factores físicos y químicos que afectan a la actividad enzimática.

La actividad catalítica de las enzimas en medio orgánico depende en gran medida de que en estos disolventes mantengan la estructura proteica, que viene condicionada por multitud de puentes de hidrógeno que se forman entre la proteína y el medio que la rodea. De hecho, las enzimas presentan su actividad óptima para una conformación definida que vendrá determinada por un conjunto de interacciones de tipo puente de hidrógeno, iónicas, covalentes e hidrofóbicas (Lehninger, 2001), por lo cual el pH de trabajo, temperatura, hidrofobicidad, etc, son de suma importancia. Para preservar esta conformación es necesaria la presencia de lo que se denomina una capa de hidratación, cuya pérdida supone normalmente un fuerte descenso en la actividad catalítica, esto es apreciable en trabajos de liofilización con lo cual es importante la utilización de agentes estabilizadores de las enzimas. Cuando los procesos de liofilización no presentan resultados satisfactorios es importante buscar alternativas como la inmovilización de la enzima. Las enzimas necesitan la mencionada capa de hidratación para realizar su actividad catalítica, sin embargo, la cantidad de agua necesaria para preservar la capa de hidratación dependerá en cada caso y en este aspecto tendrá suma importancia el disolvente utilizado y sus características.

Siendo las lipasas enzimas con un gran potencial biotecnológico, es importante conocer la temperatura óptima funcional de las mismas. Se destaca que la temperatura puede

ejerce un efecto desnaturizante sobre las proteínas al sobrepasar su óptimo funcional y con ello una disminución significativa de la actividad enzimática.

Las estructuras proteicas han evolucionado para funcionar en entornos celulares concretos. Condiciones diferentes a las de la célula pueden provocar diversos cambios en la estructura de la proteína. La pérdida de la estructura tridimensional de una proteína es suficiente para originar la pérdida de la función, proceso denominado desnaturización. La mayoría de las proteínas se pueden desnaturizar mediante calor, el cual afecta de una manera compleja a las interacciones débiles de una proteína (los enlaces puentes de hidrógenos principalmente). Si la temperatura aumenta lentamente, la conformación de la proteína generalmente permanece intacta hasta que tiene lugar una pérdida brusca de estructura (y función). Por otra parte, si trabajamos por debajo del óptimo de temperatura nos encontramos con un efecto de rigidez de la enzima, no pudiéndose adaptar de forma óptima al sustrato y por ende encontrando una menor actividad enzimática.

Otro factor de gran importancia en la actividad enzimática aparte de la fuerza iónica y la temperatura es el pH, el cual ejerce un efecto de ionización sobre las enzimas, y con ello inactivación enzimática, que a diferencia de la desnaturización térmica es un proceso reversible, mediante cambios de tampón que nos modifique el pH.

Las enzimas tienen un pH óptimo dado que algunas cadenas laterales de aminoácidos pueden actuar como ácidos o bases débiles que desarrollan funciones críticas en el sitio activo de la enzima, que dependen de su mantenimiento en un cierto estado de ionización. Por otra parte las cadenas laterales ionizadas de la proteína pueden jugar un papel esencial en las interacciones que mantienen la estructura de la proteína.

2.8.- Fuentes de lipasas.

Las primeras fuentes de lipasas fueron obtenidas a partir de las presentes en páncreas de mamíferos, generalmente cerdos, aunque también se utiliza de páncreas humano o de caballos. En la actualidad se obtienen vía fermentativa a partir de una amplia variedad de microorganismos: bacterias (Jaeger *et al.*, 1994), levaduras y hongos (Rapp y Backhauss, 1992).

Las lipasas producidas por bacterias se obtienen principalmente de *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*,

Pseudomonas fragi, *Bacillus thermocatenuatus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aerus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Achromobacter*.

Las lipasas provenientes de hongos y levaduras son de los géneros o especies *Aspergillus niger*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor meihei*, *Yarrowia*, *Penicillium camembertii*, *Geotrichum candidum*, *Torulopsis* y *Candida*.

De estos microorganismos, los más utilizados comercialmente en la producción industrial de lipasas son: *Pseudomonas*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Yarrowia*, *Rhizopus* y *Candida* (Crueger *et al.*, 1993).

La producción de lipasas a partir de cada uno de los microorganismos depende en gran medida de factores ambientales, como temperatura o pH, composición del medio de fermentación: fuentes de carbono, nitrógeno, concentración de sales inorgánicas, así como porcentaje de oxígeno disuelto, pudiendo estos factores alterar la reactividad de la enzima y la relación lipasa extracelular/intracelular.

Las condiciones habitualmente utilizadas son: temperatura alrededor de los 30° C, pH en zona neutra y condiciones aerobias. Como fuente de carbono se suele utilizar una fuente mixta compuesta por un glúcido y un lípido, actuando este último como inductor para la producción de lipasas. Como fuente de nitrógeno se suele utilizar urea o sales inorgánicas de amonio.

En la mayor parte de los casos, la producción de lipasas debe ser inducida por la adición de aceites o grasas. Por otra parte, el glicerol, el producto de la acción de las lipasas sobre los triglicéridos, inhibe el mecanismo de producción de las lipasas; también ocurre con otras fuentes de carbono como la glucosa, substrato que, al igual que el glicerol, es utilizado como fuente de carbono para generar biomasa, pero que no induce la formación de lipasas en el microorganismo. En general, las lipasas microbianas son enzimas extracelulares, aunque generalmente se encuentran unidas a la membrana externa de las células por interacciones iónicas; este fenómeno provoca una inhibición de la producción de lipasas. No obstante, en presencia de cationes como el magnesio, las lipasas adsorbidas a la pared celular de los microorganismos pueden ser liberadas al medio extracelular, incrementando así los niveles de enzima obtenidos en el medio de cultivo (Crueger *et al.*, 1993).

En el Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona se han estudiado los diversos factores que afectan a la fermentación de *Candida rugosa* para la producción de lipasas. Se estudiaron fuentes de carbono mixtas (Valero *et al.*, 1991) destacando un crecimiento óptimo en aceite de oliva y constatándose el efecto

inhibitorio del glicerol sobre la producción de lipasas. Además, se estudió el efecto de introducir los componentes del aceite de oliva, glicerol y ácido oleico, por separado observándose que se producía un crecimiento diaúxico en el cual primero se consumía el glicerol y después el ácido oleico no observándose producción de lipasa hasta el consumo de este segundo sustrato que actúa como inductor (Del Río *et al.*, 1990; Obradors *et al.*, 1993).

Por consiguiente, para la producción de lipasas por *C. rugosa* es necesario el uso de lípidos o sustratos relacionados (triglicéridos, ácidos grasos, detergentes, etc.) que actúen como sustrato inductor. Cultivos en discontinuo han demostrado que el ácido oleico es el mejor inductor ácido graso probado en *C. rugosa* (Obradors *et al.*, 1993), incluso mejor que el aceite de oliva (Del Río *et al.*, 1990). Se destaca que la presencia de interfases en el medio de cultivo en el proceso de fermentación puede ser un factor importante en el mecanismo de inducción (Dalmau *et al.*, 1998). De las diferentes estrategias operacionales implementadas: (Gordillo *et al.*, 1995), continuo (Montesinos *et al.*, 1996), y discontinuo alimentado con velocidad de alimentación constante o velocidad de crecimiento constante (Gordillo *et al.*, 1998), se concluyó que la mayor producción de lipasas se alcanzó siguiendo una estrategia de fermentación en discontinuo alimentado con una velocidad específica de crecimiento constante. La producción bajo esta estrategia fue 10 veces mayor que la producción en el mejor cultivo en discontinuo descrito (Sánchez *et al.*, 1999). Así mismo se implementó un sistema de monitorización y control y un modelo matemático del bioproceso que permitió la reproducibilidad tanto del bioproceso como de calidad de la lipasa producida. Con la anterior información se implementó el escalado de la producción a nivel de planta piloto en un fermentador de 50 L, siguiendo la estrategia de fermentación discontinua alimentada. En comparación con la lipasa de *Candida rugosa* comercial de Sigma la lipasa producida en la UAB presentó una actividad lipásica específica 75 veces superior a la comercial, con un contenido en polisacáridos 8 veces superior y un perfil de isoenzimas diferente (Sánchez *et al.*, 1999)

2.9.- Lipasas de *Candida rugosa*.

La levadura no esporogénica, pseudofilamentosa, hemiascomiceto, unicelular y no patógena *Candida rugosa* (Fig. 2.7), esta considerada como uno de los microorganismos que poseen mayor capacidad productora de lipasas (Ferrer *et al.*, 2001). En 1962 fue aislada por Yamada y colaboradores desde suelos naturales,

después Tomizuka *et al.*, 1966 aislaron y purificaron por primera vez lipasa extracelular producida por *C. rugosa*, describiendo esta lipasa, como una glicoproteína de 60 kDa con un 4,2% de azúcares neutros principalmente manosa, siendo una proteína rica en aminoácidos hidrofóbicos, particularmente en leucina e isoleucina.

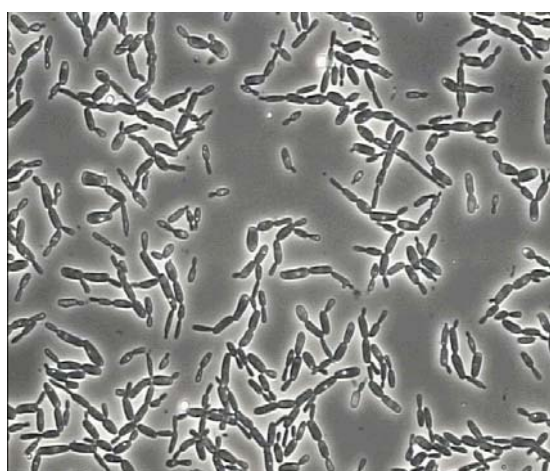


Fig. 2.7.- Fotografía de *Candida rugosa* (Extraída de Ferrer *et al.*, 2001).

Después de 20 años del primer estudio, en 1990 se publicó el primer artículo centrado en el análisis molecular de esta lipasa (Ferrer *et al.*, 2001). A partir de este estudio, aumenta significativamente el número de grupos de investigación que publicaron artículos sobre purificación y caracterización de la lipasa de *C. rugosa* partiendo, prácticamente todos, de extractos comerciales crudos (Pernas, 2003). Estos trabajos generaron cierta controversia debido a la disparidad de las conclusiones a las que llegaban, particularmente en cuanto al número de isoformas presentes en los extractos comerciales (2-3), sus pesos moleculares (58-360 kDa), posteriormente estos elevados pesos moleculares demostrarían la capacidad de agregación de las lipasas, puntos isoeléctricos (pI) entre 4-5 o el grado de glicosilación (Veeraragaban y Gibbs, 1989, Shaw *et al.*, 1989, Wu *et al.*, 1990; Brahim-Horn *et al.*, 1990; Allenmark y Ohlsson, 1992; Rua *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1994).

Estas divergencias propiciaron la hipótesis de que lo que se conocía como la lipasa de *C. rugosa* (CRL) podía ser en realidad una mezcla de isoformas estrechamente relacionadas entre sí, pero con propiedades bioquímicas catalíticas ligeramente diferentes (Pernas 2003).

Trabajos publicados por el grupo de Marina Lotti y colaboradores entre los años 1992 y 1996 demostraron la existencia en el genoma de *C. rugosa* de una familia de al menos 5 genes funcionales (*lip1-lip5*), que codificarían correlativamente para 5 lipasas (Lip1-Lip5). Cada isoenzima tendría una única cadena polipeptídica con pesos moleculares teóricos próximos a 60 kDa, pero diferentes pI y grados de glicosilación (Lotti y Alberghina, 1996). Otros estudios posteriores del mismo grupo afirman que existen al menos siete genes codificadores de lipasas de *C. rugosa* (Brocca *et al.*, 1995). No obstante, se desconocía si todos estos genes eran efectivamente funcionales.

Rúa *et al.*, en 1993 describieron un método que permite, a partir de un preparado comercial de lipasas de *C. rugosa*, aislar y purificar dos lipasas, que denominaron lipasa A y lipasa B, con similar contenido en aminoácidos y peso molecular pero distintos niveles de azúcares neutros, puntos isoeléctricos, además de diferencias claves en la estabilidad y reactividad química (Rúa *et al.*, 1992; Rúa *et al.*, 1993; Rúa y Ballesteros, 1994). Además, la secuencia N-terminal de la denominada lipasa A coincidía con la predicha para Lip3 mientras que la segunda, más compleja, se resolvía todavía en una mezcla de 4 isoformas con idéntica secuencia N-terminal, hasta el aminoácido número 11. Este estudio indicaba que al menos 2 de los isogenes *lip* de *C. rugosa* eran funcionales. Las diferentes actividades asociadas a la denominada lipasa B resultan de modificaciones post-transduccionales de Lip1 cuyo origen es todavía poco claro (Diczfalusy *et al.*, 1997; López *et al.*, 2000). Posteriormente, se comprobó que en algunos preparados comerciales existe también Lip2 aunque en cantidades muy minoritarias comparadas con Lip1 o Lip3 (Diczfalusy *et al.*, 1997). De estas dos últimas, Lip1 es mayoritaria (Rúa *et al.*, 1993, Brocca *et al.*, 1998).

El grupo de Ingeniería de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería Química de la UAB obtuvo en sus fermentaciones de *C. rugosa* usando ácido oleico como inductor básicamente una mezcla al 50% de las isoenzimas Lip2 y Lip3, sin presencia de Lip1, la isoenzima mayoritaria de los extractos comerciales, demostrándose que las condiciones de operación afectan a las isoenzimas producidas (Sanchez *et al.*, 1999; Pernas *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2002)

2.10.- Estructura de los genes *lip* de *C. rugosa*.

Como describe Brocca *et al.*, 1995 la familia de los genes que codifican para las lipasas de *C. rugosa* la integran al menos 7 genes, denominados *lip1-lip7*, cinco de los cuales han sido secuenciados y caracterizados completamente. Las secuencias de los 5 genes

ya mencionados están precedidas, en su extremo 5', por las secuencias consenso TATA y CAAT, características de los promotores de eucariotas indicando que se trata de una familia de genes funcionales (Lotti *et al.*, 1993; Lotti *et al.*, 1994^a). Esta familia parece provenir de un gen ancestral de serina-proteasas y es probable que tal evolución haya continuado incluso dentro de algunos microorganismos. Esta teoría se ve reforzada por el hecho de que todos los genes codificadores de lipasas de *C. rugosa* se encuentran situados sobre un mismo fragmento del cromosoma I (Brocca *et al.*, 1995).

Se pensaba que todos los organismos presentaban una misma decodificación triplete de bases-aminoácidos, es decir, que el código genético era universal. Sin embargo, ahora se sabe que no siempre es así y se conocen codones que han cambiado su significado durante el curso de la evolución. La mayor parte de las excepciones están limitadas a las mitocondrias y especies como los protozoos ciliados que se separaron muy pronto en la evolución de los eucariotas y afectan normalmente a las señales de terminación de la cadena polipeptídica. Se ha comprobado que algunas especies del género *Candida* (*C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *C. albicans*, *C. rugosa*, *C. maltosa*, *C. tropicalis*, etc.) leen el triplete CUG como serina en vez de leucina, lo que significó, en su momento, el primer ejemplo de un cambio en un codón de lectura de un aminoácido (Kawaguchi *et al.*, 1989; Alberghina y Lotti, 1997).

Esta excepción del código genético universal fue puesta de manifiesto por Kawaguchi y colaboradores en *C. rugosa*, al observar una discrepancia entre la relación de serinas-leucinas en la secuencia de una lipasa obtenida empíricamente y la predicha inicialmente por la secuencia de nucleótidos del gen (Kawaguchi *et al.*, 1989; Kawaguchi y Honda, 1991). A pesar de ello, generalmente, el empleo del codón CUG para codificar leucina es muy raro en distintas especies de *Candida*, como revela el hecho de que en 170 proteínas analizadas sólo aproximadamente del 2-3% de las serinas existentes fuesen codificadas por dicho codón (Pesole *et al.*, 1995). La situación es muy diferente, en el caso de *C. rugosa*, en el sentido de que muestra una preferencia muy clara por el uso de codón CUG. Así, en los siete genes productores de lipasas de esta levadura, dicho codón es el dominante, originando el 40% de los residuos serina y, en particular, las “serinas-CUG” están estrictamente conservadas (Longhi *et al.*, 1992). La pregunta más intrigante para la que todavía no se ha hallado respuesta es como ha podido surgir esta mutación y cómo ha podido conservarse en *C. rugosa*. Se ha postulado que algún tipo de presión selectiva pudo haber favorecido el alto uso del nuevo triplete (Longhi *et al.*, 1992; Alberghina y Lotti, 1997).

Es interesante analizar el patrón de distribución de las serinas-CUG y de aquellas codificadas por el codón universal, ya que prácticamente todas las serinas-CUG conservadas se concentran en la región de la proteína directamente involucrada en la interacción con el sustrato (sitio activo, incluyendo la serina catalítica, y zona de interacción con la interfase) (Longhi *et al.*, 1992). Además, dos de estas serinas-CUG se conservan también en posiciones equivalentes en las dos isoenzimas de la lipasa de *Geotrichum candidum*, ambas englobadas en una misma familia de proteínas, e incluso una se conserva en otras proteínas hidrolíticas más distantes pero también pertenecientes a la misma familia (acetilcolinesterasas) (Alberghina y Lotti, 1997).

Estos análisis parecen indicar que los residuos serina importantes para la función catalítica o estructural están codificadas por codones CUG. Sin considerar la importancia filogenéticas, la alta prevalencia del codón CUG en *C. rugosa* ha significado un serio inconveniente a la hora de expresar estos genes en organismos hospedadores. En este sentido, cabe mencionar que algunos genes *C. albicans* o *C. maltosa* (que también utilizan el codón anormal, aunque con una frecuencia muy inferior a *C. rugosa*) han podido ser expresados de forma correcta en sistemas de expresión convencionales tales como *S. cerevisiae* (Fu *et al.*, 1997, Mileto *et al.*, 1998). En el caso de *C. rugosa* el problema no es únicamente por la alta frecuencia de uso del codón CUG para serina, sino también por la posición de estas serinas en la secuencia, como se ha mencionado, afectando incluso al sitio activo y produciéndose en microorganismos hospedadores una lipasa heteróloga no activa desde el punto de vista catalítico.

2.10.1.- Secuencia del gen *lip2* y estructura tridimensional de Lip2.

La secuencia nucleotídica de *lip2* (Fig. 2.8) se encuentra disponible en la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>), siendo su número de acceso X64704. La secuencia de aminoácidos deducida a partir de *lip2* se encuentra disponible en la base de datos de swissprot (<http://www.expasy.ch>) con el número de acceso P32946.

La estructura tridimensional y cristalización de Lip2 (Fig. 2.9) fue resuelta por Mancheño *et al.*, 2002.

```

agg ctg tcg cac gtc act gct gct tgg ctt tgc cag cat gtg gcc ccc acg gcc acc ctc gcc aac
M K L C L L A L G A A V A A A P T A T L A N
ggc gac acc atc acc ggt ctc aac gcc att gtc aac gaa aag ttt ctc ggc ata ccg ttt gcc gag
G D T I T G L N A I V N E K F L G I P F A E
ccg ccc gtg ggc acg ctc cgc ttc aag ccg ccc gtg ccg tac tcg gcg tcg ctc aac ggc cag cag
P P V G T L R F K P P V P Y S A S L N G Q Q
ttt acc ctg tac ggc ccg ctg tgc atg cag atg aac cct atg ggc tcg ttt gag gac aca ctt ccc
F T S Y G P S C M Q M N P M G S F E D T L P
aag aat gcg cgg cat ttg gtg ctc cag tcc aag atc ttc caa gtg gtg ctt ccc aac gac gag gac
K N A L D L V L Q S K I F Q V V L P N D E D
tgt ctc acc atc aac gtg atc cgg ccg ccc ggc acc agg gcc agt gct ggt ctc ccg gtg atg ctc
C L T I N V I R P P G T R A S A G L P V M L
ttg atc ttt ggc ggt ggg ttt gag ctt ggc ggc tcc agc ctc ttt cca gga gac cag atg gtg gcc
W I F G G G F E L G G S S L F P G D Q M V A
aag agc gtg ctc atg ggt aaa ccg gtg atc cac gtg agc atg aac tac cgc gtg gcg tca tgg ggg
K S V L M G K P V I H V S M N Y R V A S W G
ttc ttg gcc ggc ccc gac atc cag aac gaa ggc agc ggg aac gcc ggc ttg cat gac cag cgc ttg
F L A G P D I Q N E G S G N A G L H D Q R L
gcc atg cag tgg gtg gcg gac aac att gct ggg ttt ggc ggc gac ccg agc aag gtg acc ata tac
A M Q W V A D N I A G F G D P S K V T I Y
ggc gag ctg gcg ggc agc atg tcg acg ttt gtg cac ctt gtg tgg aac gac ggc gac aac acg tac
G E S A G S M S T F V H L V W N D G D N T Y
aac ggc aag ccg ttg ttc cgc gcc gcc atc atg cag ctg ggc tgc atg gtg ccg ctg gac ccg gtg
N G K P L F R A A I M Q S G C M V P S D P V
gac ggc acg tac ggc acc gag atc tac aac cag gtg gtg gcg tct gcc ggg tgt ggc agt gcc agc
D G T Y G T E I Y N Q V V A S A G C G S A S
gac aag ctc gcg tgc ttg cgc ggc ctt ctg cag gac acg ttg tac cag gcc acg agc gac acg ccc
D K L A C L R G L S Q D T L Y Q A T S D T P
ggc gtg ttg gcg tac ccg tcg ttg cgg ttg ctg tat ctc ccg cgg ccc gac ggc acc ttc atc acc
G V L A Y P S L R L S Y L P R P D G T F I T
gac gac atg tat gcc ttg gtg cgg gac ggc aag tac gca cac gtg ccg gtg atc atc ggc gac cag
D D M Y A L V R D G K Y A H V P V I I G D Q
aac gac gag ggc act ttg ttt ggg ctc ctg ctg ttg aac gtg acc aca gat gct cag gca cgg gcg
N D E G T L F G L S S L N V T T D A Q A R A
tac ttc aag cag ctg ttc atc cac gcc agc gat gcg gag atc gac acg ttg atg gcg gcg tac acc
Y F K Q S F I H A S D A E I D T L M A A Y T
agc gac atc acc cag ggt ctg ccg ttc gac acc ggc atc ttc aat gcc atc acc ccg cag ttc aaa
S D I T Q G S P F D T G I F N A I T P Q F K
cgg atc ctg gcg ttg ctt ggc gac ctt gcg ttc acg ctt gcg cgt cgc tac ttc ctc aac tac tac
R I S A L L G D L A F T L A R R Y F L N Y Y
cag ggc ggc acc aag tac tcg ttt ctc ctg aag cag ctt ctg ggg ttg ccc gtc ttg ggc acc ttc
Q G G T K Y S F L S K Q L S G L P V L G T F
cac ggc aac gac atc atc tgg cag gac tac ttg gtg ggc agc ggc agt gtg atc tac aac aac gcg
H G N D I I W Q D Y L V G S G S V I Y N N A
ttc att gcg ttt gcc aac gac ctc gac ccg aac aag gcg ggc ttg tgg acc aac tgg ccc acg tac
F I A F A N D L D P N K A G L W T N W P T Y
acc agc agt ctg cag ctg ggc aac aac ttg atg cag atc aac ggc ttg ggg ttg tac acc ggc aag
T S S S Q S G N N L M Q I N G L G L Y T G K
gac aac ttc cgc ccg gat gcg tac agc gcc ctc ttt tcc aac ccg cca ctg ttc ttt gtg tag
D N F R P D A Y S A L F S N P P S F F V Stop

```

Fig. 2.8.- Secuencia de nucleótidos que conforman la proteína Lip 2 nativa. En azul la secuencia que codifica para el péptido señal y sus respectivos aminoácidos, en negrita y subrayados las serinas, y de estas en rojo las que provienen de una secuencia no-universal, en marrón el residuo de N-glicosilación, en verde los residuos del sitio activo.

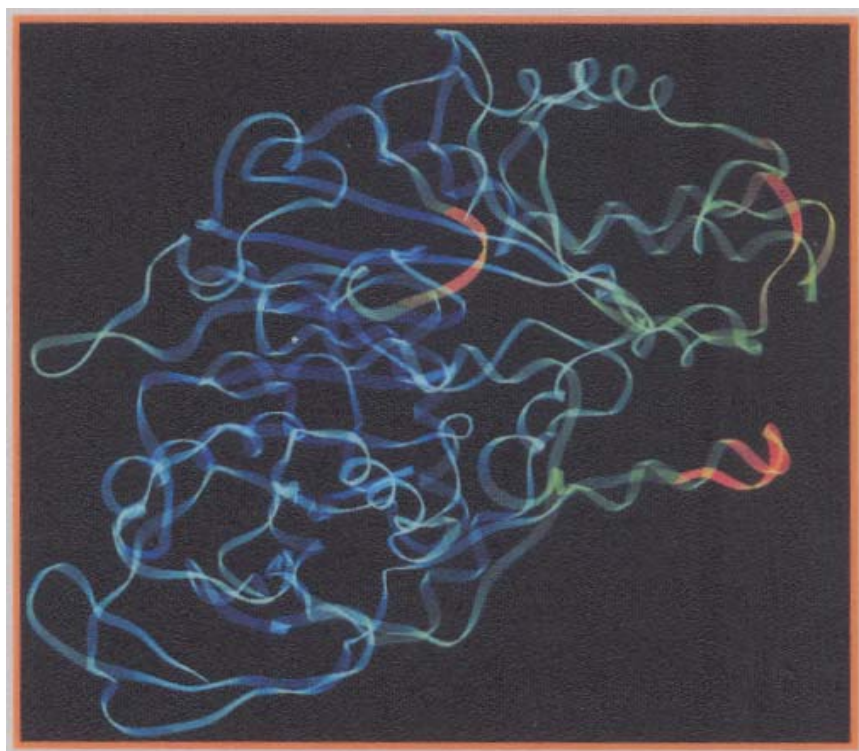


Fig. 2.9.- Estructura de la proteína Lip2 (extraído de Pernas 2003). Los colores rojo y verde que se indican en la estructura corresponden al sitio activo de la enzima Lip2, sitio activo en forma de túnel, mostrando la enzima en este caso su conformación abierta al sustrato.

2.10.2.- Análisis comparativo del producto de los genes lip de *C. rugosa*.

En la familia de lipasas de *C. rugosa*, se presenta una homología de secuencia de aminoácidos significativa, entre el 77% y el 88% para pares de isoenzimas. En la tabla 2.1 se compara el grado de similitud entre las secuencias aminoacídicas predichas a partir de las secuencias de DNA de los 5 genes que Lotti y colaboradores han caracterizado (Lotti *et al.*, 1994^a). Como se puede apreciar, lip1 y lip3 son las isoenzimas con mayor homología (88%) mientras que en el extremo opuesto se encuentran Lip2 y Lip5 (77%).

Tabla 2.1. Homología de las secuencias aminoacídicas en parejas de las diversas isoenzimas lipasas de *C. rugosa* (ex. de Lotti *et al.*, 1994^b; Pernas., 2003).

Gen	lip1	lip2	Lip3	Lip4	lip5
lip1	100	-	-	-	-
lip2	79	100	-	-	-
lip3	88	82	100	-	-
lip4	81	83	84	100	-
lip5	81	77	86	78	100

Las proteínas maduras, lipasas de *C. rugosa*, una vez escindida la secuencia señal de 14-15 residuos, están constituidas por 534 aminoácidos (Lotti *et al.*, 1994^b). Cada una puede ser diferenciada del resto de la familia comparando sus secuencias N-terminales (Tabla 2.2). Así, Lip3 se diferencia en el quinto aminoácido, lisina (K) en Lip3 y treonina (T) en el resto de las isoenzimas. Si se extiende el análisis de la secuencia hasta el aminoácido 19 es posible diferenciar Lip2, en el aminoácido 30 Lip4, Lip5 en el aminoácido 45 y Lip1 en el 49, y es necesario llegar al aminoácido 45 y 49 para diferenciar Lip5 y Lip1, respectivamente (Tabla 2.2).

Es importante señalar que esta familia de lipasas presenta 1 o 3 sitios de N-glicosilación, de los cuales uno (Asn 351) aparece conservado en todos los miembros de la familia, el cual está muy próximo a su sitio activo. Es más, estudios de cristalografía y mutagénesis de sitio dirigida sugieren que la glicosilación de este residuo tiene un papel importante en la actividad catalítica del enzima, estabilizando la conformación abierta de su centro activo (Longhi *et al.*, 1992).

Tabla 2.2.- Análisis de las características estructurales de las diferentes lipasas de *C. rugosa* basado en su secuencia nucleotídica (ex. de Lotti *et al.*, 1994^b; Ferrer *et al.*, 2001).

Gen	PM (kDa)	pI	<i>Sitios de N-glicosilación</i>		Secuencia N-Terminal
			Nº	Residuos	
<i>lip1</i>	57,223	4,50	3	291, 314, 351	APTATLANGDTTITGLN AI INE A FLGIPFA E PPVGNLRF KDPVPY S GS L DG
<i>lip2</i>	57,744	4,90	1	351	APTATLANGDTTITGLN AI VNE K FLGIPFA E PPV G TLRF KPPVPY S AS L NG
<i>lip3</i>	57,291	5,10	3	291, 314, 351	APT A KLANGDTTITGLN AI INE A FLGIPFA E PPVGNLRF KDPVPY S GS L NG
<i>lip4</i>	57,0510	5,70	1	351	APTATLANGDTTITGLN AI INE A FLGIPFA Q PPVGNLRF KPPVPY S AS L NG
<i>lip5</i>	57,957	5,50	3	291, 314, 351	APTATLANGDTTITGLN AI INE A FLGIPFA E PPVGNLRF KDPVPY R GS L NG

En la secuencia de aminoácidos los marcados en negrita representan el punto de variación ubicado consecutivamente en los aminoácidos 5, 19, 22, 30, 35, 40, 45, 46 y 49. pI = punto Isoeléctrico PM= Peso Molecular

La alta homología de la secuencia de aminoácidos, entre las lipasas de *C. rugosa*, genera un estrecho margen de variación tanto de los pesos moleculares próximo a 60 kDa, como de los puntos isoeléctricos (pIs) que varían entre 4,5 y 5,7 (Tabla 2.2). Además, la heteroglicosilación de una misma isoenzima, es decir, la existencia de diversas formas de una glicoproteína debido a diferencias en su composición y/o longitud de la cadena de oligosacáridos, en esencia de N-glicanos, fenómeno recurrente al estudiar glicoproteínas, también se ha observado para lipasas de *C. rugosa* y *G. candidum* (Pernas *et al.*, 2000; Hendrich *et al.*, 1993; Holmquist *et al.*, 1997). El fenómeno de oligomerización, que consiste en la formación de homodímeros estables con implicaciones en la función de la proteína (Kaiser *et al.*, 1994; Pernas *et al.*, 2001),

se ha descrito también para las lipasas de *C. rugosa*, lo que puede llevar a la existencia de diversas isoformas de cada isoenzima. Por otro lado, las lipasas de éste organismo presentan una importante capacidad de asociación con componentes no proteicos como por ejemplo polisacáridos (Sánchez *et al.*, 1999).

Además, existe una regulación diferencial de la expresión de los genes *lip* según las condiciones de cultivo, tal y como lo demostró el grupo de Lee y colaboradores mediante RT-PCR (transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa), mostrando que los niveles de expresión siguen el orden (de mayor a menor): *lip1*, *lip3*, *lip2*, *lip5*, *lip4*. La expresión de *lip1* y *lip3* es siempre constitutiva mientras que la del resto depende de las condiciones de crecimiento, cultivando *C. rugosa* con medio YM (0.3% extracto de levadura, 0.3% extracto de malta, 0.5% peptona y 1% dextrosa) cultivadas por 24 h a 30 °C e inducida con ácido oleico (Lee *et al.*, 1999). En tanto, Sánchez *et al.*, 1999 al cultivar *C. rugosa* sobre ácido oleico como única fuente de carbono, las formas mayoritarias de isoenzimas fueron Lip2 y Lip3.

De todo lo anterior, se desprende la dificultad para el desarrollo de procesos eficientes de aislamiento, purificación y producción de las distintas lipasas de *C. rugosa*.

2.11.- Purificación de las lipasas de *C. rugosa*.

Como ya se ha mencionado, la síntesis y secreción de lipasas de *C. rugosa* es un proceso complejo, puesto que varias isoenzimas de lipasa de propiedades físico-químicas (peso molecular, hidrofobicidad, punto isoeléctrico) muy parecidas se producen simultáneamente, lo que resulta en una purificación dificultosa (comprende numerosas etapas de purificación) y por ende de bajo rendimiento global.

En el proceso de purificación de las lipasas nativas (obtenidas de cultivos de *C. rugosa*), algunos autores (Pernas, 2003) realizan tratamientos previos a los extractos crudos, como operaciones de centrifugación, tratamientos con detergentes, precipitación o diálisis, en las que se eliminan gran parte de las impurezas solubles e insolubles que contienen los preparados comerciales o los post-incubados.

Una problemática bastante común en la purificación de lipasas nativas surge de la presencia de sustancias de naturaleza lipídica, por ende no solubles, utilizadas para la inducción de la producción de las lipasas (triglicéridos, ácidos grasos, ácido oleico entre otros). Además, algunos microorganismos, como *C. rugosa* o *Pseudomonas aeruginosa*, producen polisacáridos de alta viscosidad que dificultan la purificación de

las diferentes isoenzimas, ya que se unen a las lipasas generando la formación de agregados moleculares (Stuer *et al.*, 1986; Taipa *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 1999). En el caso concreto de *C. rugosa*, cuando crece en presencia de ácido oleico, produce un polisacárido de peso molecular superior a 400 kDa que actuaría como un emulsionante (Serrano, 1998; Sanchez *et al.*, 1999). Así, la purificación de las lipasas a partir de estos complejos no es fácil, siendo necesario recurrir a precipitaciones con solventes orgánicos o detergentes, a pesar de lo cual, los rendimientos de actividad obtenidos han sido bajos (Deutscher, 1990; Taipa *et al.*, 1995; Pernas *et al.*, 2000). Dado el carácter hidrofóbico local de las lipasas, las matrices cromatográficas de carácter hidrofóbico, que disponen como ligandos grupos fenilos, butilos, octilos, entre otros, se presentan como una alternativa eficiente para la purificación de lipasas e incluso algunos autores tratan la cromatografía hidrofóbica, aplicada a lipasas, como un método de cromatografía de afinidad (Aires-Barros *et al.*, 1994), o método de inmovilización (Balcao *et al.*, 1996).

Por consiguiente, las dificultades en el proceso de purificación de las diferentes isoenzimas producidas por *Candida rugosa* tiene que salvar dos importantes escollos: La eliminación de la presencia del polisacárido y la separación de las diferentes isoenzimas que presentan una alta homología. En colaboración con el grupo de la Dra. Rúa de la Universidad de Vigo (Campus Ourense) se desarrolló un protocolo de purificación que incluía tratamiento con detergentes, cromatografías de interacción hidrofóbica y aniónica y gel filtración (Sánchez *et al.*, 1999). El proceso sólo permitió recuperar el 17% de la actividad enzimática final, siendo los rendimientos obtenidos del 7.6% respecto a la purificación de Lip3 y 9.5% respecto a Lip2.

Estos bajos rendimientos, conjuntamente con la relativa complejidad del proceso de purificación y el tiempo y equipos necesarios para la obtención de las isoenzimas puras, hacen que esta aproximación sea inviable desde el punto de vista de su implementación industrial para la obtención de las isoenzimas puras.

Por consiguiente si se quiere disponer las isoenzimas puras de la lipasa de *Candida rugosa* sólo queda la opción de obtenerlas de manera heteróloga, mediante su producción en microorganismos recombinantes.

2.12- Sistemas de expresión de proteínas heterólogas.

Las técnicas de DNA recombinante junto con los avances sobre el conocimiento de la fisiología y el metabolismo microbiano, han permitido el diseño de procesos donde los microorganismos se utilizan como factorías celulares. Debido a esto, en la última década, ha aumentado de forma exponencial la producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico o industrial. Esta metodología ya se ha integrado totalmente en los procesos de producción en todas las empresas biotecnológicas.

Las fases necesarias para la producción comercial de proteínas recombinantes son:

- Clonación del gen de interés en un vector de expresión.
- Transformación del microorganismo huésped (sistema de expresión).
- Proceso de selección de los transformantes.
- Crecimiento del microorganismo y expresión de la proteína en biorreactores.
- Recuperación y purificación de la proteína.

El tipo de sistema de expresión a utilizar se selecciona en función de diferentes parámetros, como el rendimiento de la producción de proteína, el éxito en las modificaciones y el procesamiento post-traducciona, el plegamiento y la glicosilación de la proteína de interés, la viabilidad económica, el posterior proceso de purificación, etc...

En la tabla 2.3 se describen algunas ventajas y desventajas de los principales sistemas de expresión utilizados (Rai *et al.*, 2001).

A pesar de poder clasificar de forma generalizada las ventajas e inconvenientes que presentan cada uno de los sistemas de expresión, la selección del sistema de expresión dependen de múltiples factores, que se han de estudiar de forma más detallada e individual puesto que, la maximización de la producción de las proteínas heterólogas para su uso comercial es compleja y, en parte, empírica (Rai *et al.*, 2001). Se considera que actualmente se está en los primeros pasos del conocimiento de los diferentes sistemas de expresión, ya que muchos de los factores de los que depende la producción, se optimizan de forma empírica (Cos, 2005).

Tabla 2.3 ventajas y desventajas de los principales sistemas de expresión de proteínas heterólogas.

Tipos de células de expresión	Ventajas	Desventajas
Células de mamíferos	<input checked="" type="checkbox"/> Producción correcta de proteínas de mamíferos	<input checked="" type="checkbox"/> Elevado costo del medio de cultivo. <input checked="" type="checkbox"/> Sistema de cultivo muy complejo. <input checked="" type="checkbox"/> Crecimiento muy lento
Células de insectos	<input checked="" type="checkbox"/> Rendimiento elevado. <input checked="" type="checkbox"/> Correcto plegamiento de las proteínas. <input checked="" type="checkbox"/> Modificaciones postraduccionales.	<input checked="" type="checkbox"/> Costo elevado de los medios de cultivo <input checked="" type="checkbox"/> Crecimiento lento <input checked="" type="checkbox"/> Producen proteínas de mamíferos, pero no glicosilan correctamente
Levaduras y hongos	<input checked="" type="checkbox"/> Rendimiento elevado. <input checked="" type="checkbox"/> Modificaciones postraduccionales. <input checked="" type="checkbox"/> Sistema de excreción extracelular. <input checked="" type="checkbox"/> Purificación simple <input checked="" type="checkbox"/> Numero de vectores de expresión en aumento. <input checked="" type="checkbox"/> Medio relativamente económico.	<input checked="" type="checkbox"/> Degradación de proteínas en el medio por la presencia de proteasas <input checked="" type="checkbox"/> Crecimiento mas lento que las bacterias
Bacterias	<input checked="" type="checkbox"/> Fisiología simple. <input checked="" type="checkbox"/> Tiempo de generación corto. <input checked="" type="checkbox"/> Medios de cultivos simples y económicos. <input checked="" type="checkbox"/> Alto numero de vectores de expresión	<input checked="" type="checkbox"/> Rendimiento bajo por la poca estabilidad <input checked="" type="checkbox"/> Producción de proteínas toxicas <input checked="" type="checkbox"/> No realizan modificaciones postraduccionales

En concreto, el uso de las levaduras como sistemas de expresión de proteínas heterólogas ha estado ampliamente estudiado. Las levaduras combinan la facilidad de manipulación genética y de cultivo de *E. coli* con la capacidad eucariota de realizar modificaciones post-traduccionales sobre las proteínas como las glicosilaciones, la adición de puentes disulfuros o el procesamiento proteolítico y con respecto al cultivo de células CHO o células de insectos, presentan la ventaja de la mayor velocidad de crecimiento y la economía con respecto a los medios de cultivo e implementación para realizar las fermentaciones.

2.13.- La levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

El interés por las levaduras metilotróficas surge en 1969, cuando Koichi Ogata descubre la capacidad de ciertas especies de levaduras de crecer sobre metanol como única fuente de carbono (Higgins y Cregg 1998). A principios de los años 70 la compañía Phillips

Petroleum desarrolló procesos de cultivo a elevadas densidades celulares basados en este tipo de levaduras como fuente económica de producción de proteína unicelular (*single cell protein, scp*) a partir de metanol, producto residual de la industria petrolera. Las investigaciones sobre la utilización del metanol por levaduras se centraron inicialmente en *Kloeckera* sp, aislada por Ogata en 1969. Desde entonces otras levaduras se han aislado sobre este sustrato, pero solamente seis de los 39 géneros de levaduras han demostrado la capacidad de crecer en metanol como única fuente de carbono. La gran parte de las levaduras metilotróficas pertenecen a los géneros *Hansenula*, *Candida*, *Pichia* y *Turolopsis*. Estas levaduras representan a la gran mayoría de las eucariotas que crecen en metanol exceptuando tres especies de hongos miceliares.

Todas las levaduras metilotróficas se dividen por gemación, en la mayoría de los casos ésta se da en diferentes lugares de la superficie celular y no sólo en los polos de la célula. *Hansenula* y *Pichia* son Ascomicetos que producen ascosporas sexuales, mientras que *Candida*, *Kloeckera*, *Turolopsis* y *Rhodotolula* son asporógenas y no producen esporas sexuales (Higgins y Cregg., 1998). Algunos estudios han demostrado, a partir del análisis del contenido en G+C y otras características fisiológicas, que los Ascomicetos *Hansenula* y *Pichia* están taxonómicamente muy cercanos y sugieren que las asporógenas *Turolopsis* y *Candida* podrían ser formas más primitivas que las dos anteriores (Lee *et al.*, 1980).

Fue en los años 80, después de la crisis del petróleo en que *P. pastoris* deja de ser un proceso económicamente viable para la producción de proteína unicelular (SCP) a partir de metanol, en este punto la *Phillips Petroleum Company* se pone en contacto con el Salk Institute Biotechnology-Industrial Associates Inc. (SIBIA), para desarrollar un sistema de expresión de productos heterólogos en *Pichia pastoris*. Los investigadores de SIBIA aislaron el gen de la alcohol oxidasa1 (AOX1) y su promotor, generando una serie de vectores, cepas y métodos para la manipulación genética de *P. pastoris*. Estos nuevos avances, conjuntamente con los conocimientos que ya se tenían sobre los medios de crecimiento y las operaciones en biorreactor desarrolladas para la SCP, desembocó en un sistema de expresión con el que se han obtenido altos niveles de proteínas heterólogas de interés académico, industrial y terapéutico (Cregg *et al.* 1985, Tschopp *et al.*, 1987). En 1993 Phillips Petroleum cedió las patentes sobre el sistema de expresión de *P. pastoris* a Reserch Corporation Technologies (RCT), permitiendo a

Invitrogen Corporation comercializar los componentes de su sistema de expresión para su uso académico.

2.13.1.-Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas.

El hecho común en todas las levaduras metilotróficas es su capacidad para metabolizar el metanol como única fuente de carbono y energía (Higgins *et al.*, 1998). En la Fig. 2.9 se presenta un esquema, de las principales reacciones del metabolismo de degradación del metanol en estas levaduras.

El sistema de *P. pastoris* se basa en la regulación del promotor del gen *aox1*, inducible por metanol. La enzima alcohol oxidasa (AOX) es la responsable de catalizar el primer paso de la ruta de degradación del metanol a formaldehído, obteniendo también como subproducto peróxido de hidrógeno. Este último es un componente tóxico para las células y por eso utilizan las catalasas para su degradación. Este proceso consume oxígeno, utilizado como el aceptor final de electrones.

A diferencia de las bacterias metilotróficas, esta reacción se lleva a cabo en el interior de los peroxisomas. Además, la oxidación del metanol a formaldehído no genera NAOH, por lo que la energía se libera en forma de calor.

El peso molecular de la AOX es aproximadamente de 600 KDa (van Dijken *et al.*, 1976) y puede llegar a representar hasta el 30% del total de proteína celular soluble (Cregg *et al.* 1989), probablemente para compensar la poca afinidad de la enzima por el oxígeno (Cregg *et al.*, 1993). Este hecho es muy importante, ya que la expresión de las proteínas heterólogas bajo el promotor del gen *aox1* puede, a priori, traducirse en una gran producción de nuestra proteína de interés.

En la oxidación completa del metanol en levaduras metilotróficas se pueden diferenciar dos vías metabólicas distintas. La primera corresponde a la vía disimilatoria. Esta corresponde a la sección I de la Fig. 2.10, y comienza con la salida del formaldehído del interior del peroxisoma; este compuesto es oxidado secuencialmente hasta ácido fórmico y dióxido de carbono, obteniéndose energía en forma de NADH. Es sabido que en las levaduras metilotróficas, parte de la energía necesaria para la actividad celular se obtiene de la oxidación del NADH en el citosol. Hay diversos estudios que muestran que esta ruta tiene un papel detoxificador del formaldehído (Ferrer *et al.*, 2001).

Por otro lado, existe la vía asimilatoria, indicada en la Fig. 2.10 sección II, en la cual se generan triosas a partir del formaldehído inicial.

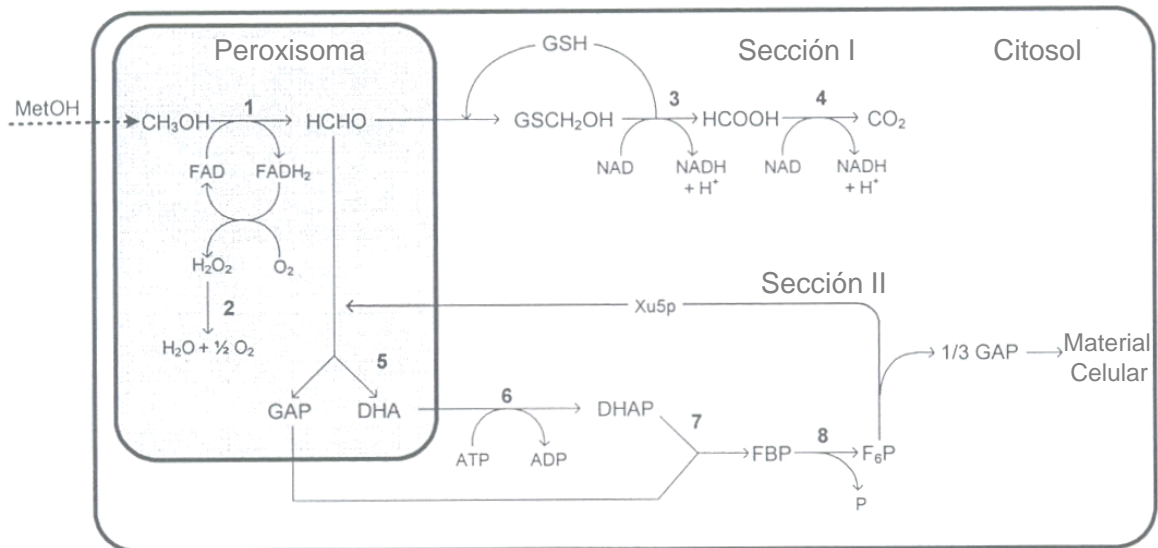


Fig. 2.10.- Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas. Sección I, vía disimilatoria, para la obtención de energía y sección II, vía asimilatoria, para la generación de biomasa. Enzimas: 1.- Alcohol Oxidasa (AOX), 2.- Catalasa, 3.- Formaldehído deshidrogenada (FLD), 4.- Formiato deshidrogenada (FMD). 5.-dihidroxiacetona sintasa (DAS), 6.- Dihidroxiacetona quinasa, 7.- Fructosa 1,6 bifosfato aldolasa, 8.- Fructosa 1,6 bifosfato fosfatasa. Metabolitos: CH₃OH (metanol), HCHO (formaldehído), GSCH₂OH (S-formilglutitona), HCOOH (formiato), CO₂ (dióxido de carbono), GAP (gliceraldehído monofosfato), DHA (dihidroxiacetona), DHAP (dihidroxiacetona fosfato), FBP (fructosa 1,6 bifosfato), F₆P (fructosa 6 fosfato), Xu5P (xilulosa monofosfato) (adaptado de Cos, 2005).

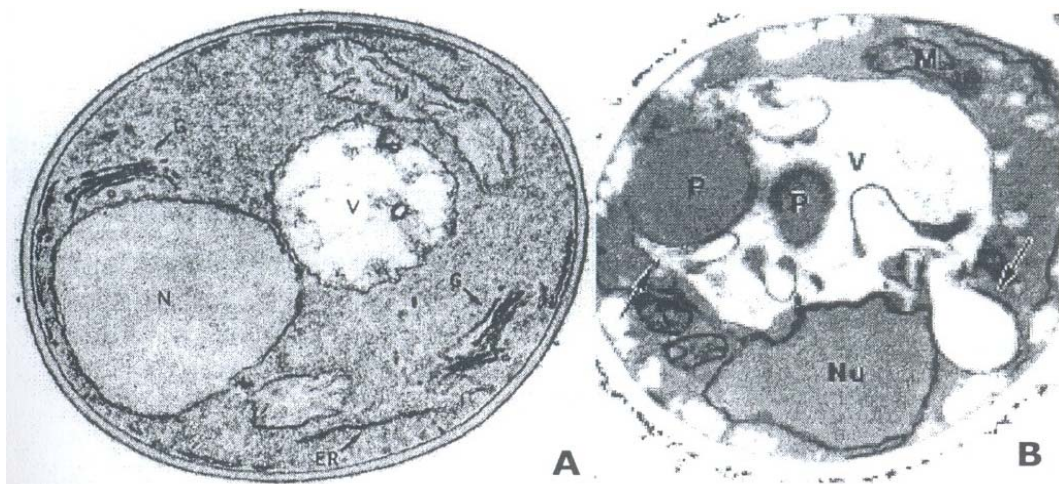


Fig. 2.11.- Sección de una célula de *Pichia pastoris* creciendo en glicerol (A) y metanol (B) (adaptado de Cos, 2005).

El balance neto de la vía asimilatoria es la formación de un mol de triosas (DHA y GAP) por cada tres moles de formaldehído y tres moles de ATP (Goodman *et al.*, 1985).

Se ha de mencionar, la estrecha relación entre la utilización del metanol con la proliferación de peroxisomas en el interior de la levadura. Este organelo contiene en su interior un gran número de enzimas metabólicas involucradas directamente con la β -oxidación de los ácidos grasos, la eliminación del peróxido de hidrógeno y la oxidación del metanol (Subramani., 1998).

Como se observa en la figura 2.11, los cambios en el interior de la levadura son evidentes en función de la fuente de carbono empleada. En la imagen A de la Fig. 2.11 se presenta una micrografía del interior de una célula de *Pichia pastoris* creciendo en glicerol, y como se aprecia no se detecta la presencia de peroxisomas. En cambio, cuando el mismo microorganismo crece en metanol (Fig. 2.11, imagen B) la presencia de este organelo es evidente. Actualmente se han identificado los complejos mecanismos y las proteínas involucradas en la aparición y desaparición de los peroxisomas en función de la fuente de carbono consumida (Rossanese *et al.*, 1999).

2.13.2.- *Pichia pastoris* como sistema de expresión recombinante de proteínas: Base conceptual y características.

La levadura *P. pastoris* es una levadura metilotrófica facultativa que pertenece al grupo de los ascomicetos, se reproduce por gemación, la formación de la espóra es homotálica y su dotación genómica es haploide (n) (Lin Cereghino *et al.*, 2002).

La clasificación taxonómica de la levadura *Pichia pastoris* (TaxId:4922, swiss-prot) es:

Reino: *Fungi*

Phylum: *Ascomycycota*

Subphylum: *Saccharomycotina*

Clase: *Saccharomycetes*

Orden: *Saccharomycetales*

Familia: *Saccharomycetaceae*

Genero: *Pichia*

Especie: *pastoris*

Las principales fuentes de carbono que puede asimilar *Pichia pastoris* son la glucosa, metanol, glicerol, etanol, L-ramanosa, trehalosa, D-manitol y D-glucitol. Como fuente de nitrógeno principalmente asimila amonio.

Este sistema de expresión (*P. pastoris*) se ha convertido en uno de los más utilizados para la expresión de proteínas heterólogas de eucariotas, ha demostrado ser una alternativa eficiente al uso de *S. cerevisiae* como sistema clásico de expresión de proteínas heterólogas por diferentes factores (Lin *et al.*, 2002), entre los más importantes destacan:

- La levadura *P. pastoris*, es un microorganismo unicelular de fácil manipulación y cultivo. Presenta características similares con respecto a las técnicas de manipulación genética de *S. cerevisiae*, permitiendo la aplicación de sus técnicas de manipulación genética.
- Se consiguen grandes niveles de expresión de proteínas heterólogas intra y extracelular en medios sintéticos y baratos.
- Tiene un fuerte promotor derivado del gen de la alcohol oxidasa 1 (AOX1), de fácil manipulación, eficiente e inducible por metanol y fuertemente reprimido por otras fuentes de carbono, como la glucosa o el glicerol. Esta es una de las principales propiedades que justifican el éxito de *P. pastoris*.
- Al tratarse de un microorganismo eucariota proporciona un gran número de ventajas, ya que es capaz de realizar modificaciones postraduccionales de las proteínas expresadas (plegamiento, enlaces disulfuros, glicosilación, etc.).
- Es una levadura con un metabolismo fundamentalmente respiratorio, característica que facilita el desarrollo de cultivos a elevadas densidades celulares, en comparación con levaduras fermentativas.
- No produce fenómenos de hiperglicosilación de las proteínas eucariotas superiores, en contraste con *S. cerevisiae*, disminuyendo las posibles respuestas inmunogénicas de los organismos en donde se han de aplicar.
- Al tratarse de un microorganismo haploide cualquier modificación genética se manifiesta fenotípicamente en generaciones posteriores.
- No excreta prácticamente proteínas nativas al medio extracelular, facilitando de esta forma la recuperación y posterior purificación de las proteínas producidas (cuando la expresión es extracelular).

- Este sistema de expresión de proteínas tiene éxito ya que se caracteriza por ser un método rápido, fácil y económico (Invitrogen, 2000) comparado con el sistema de expresión de eucariontes superiores, como células de insectos o mamíferos.

Como se ha mencionado anteriormente, la enzima alcohol oxidasa es utilizada en la primera reacción de la degradación del metanol. Su síntesis está regulada por el promotor P_{AOX1} , fuertemente reprimido cuando *P. pastoris* está creciendo en la mayoría de las fuentes de carbono que no son el metanol (glucosa, glicerol, etc.) y por el contrario, rápidamente inducido en presencia de metanol como única fuente de carbono. Sin embargo los estudios sobre la AOX de *P. pastoris* revelaron la existencia de dos enzimas alcohol oxidasa, conocidas como la alcohol oxidasa 1 (AOX1) y alcohol oxidasa 2 (AOX2) y por ende de dos genes *aox*, el *aox1* y el *aox2* (Cregg *et al.*, 1985; Cregg & Maden, 1987). Las secuencias de nucleótidos de los genes son idénticas en un 92% y las proteínas que codifican tienen un 95% de homología en la composición aminoacídica y un 3% en cuanto a actividad específica (Koutz *et al.*, 1989). Las diferencias entre estos dos genes aparecen en su nivel de transcripción. Estas secuencias están reguladas a nivel de transcripción de manera muy similar, no obstante el gen *aox1* es el responsable del 90% de la alcohol oxidasa que encontramos en la célula y el *aox2* codifica solamente el 10% restante (Cregg *et al.*, 1989). Se cree que las diferencias en el nivel de transcripción entre estos dos genes vienen dadas por las regiones homólogas que se encuentran en 5' y 3'. La existencia de dos genes que codifican prácticamente la misma proteína apunta a un origen evolutivo. La mayoría de los estudios en este sentido apuntan que hace más de cien millones de años se produjo un fenómeno de duplicación genómica en algunas levaduras y una translocación recíproca entre fragmentos de ADN que generó secuencias homólogas dispersadas como parejas de regiones duplicadas a lo largo del genoma (Seoighe *et al.*, 1998). Este fenómeno, también se reproduce en otras levaduras como *S. cerevisiae*, particularmente con la enzima alcohol deshidrogenada (ADH1 y ADH2) (Cregg *et al.*, 1989; Cregg *et al.*, 1987).

La elevada tasa de transcripción del gen *aox1* en metanol, es uno de los principales motivos por el cual su promotor (P_{aox1}) ha estado tan ampliamente utilizado para la expresión de proteínas heterólogas recombinantes en *P. pastoris*; otro motivo es su buena regulación. Los niveles de mRNA por la alcohol oxidasa durante el crecimiento

en metanol como fuente de carbono superan el 5% del total de mRNA polyA. En cambio, en crecimientos con glucosa o glicerol como única fuente de carbono los niveles de transcripción de los genes *aox* son prácticamente nulos (Harder et al., 1989).

2.13.3.- Construcción de un vector de expresión en *Pichia pastoris*.

Todos los vectores utilizados para la expresión de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris* están formados por:

- ∂ Un promotor de la transcripción.
- ∂ Una o más ubicaciones de restricción (donde clonar el gen de la proteína deseada).
- ∂ Una secuencia terminal 3' de la misma *P. pastoris* para asegurar la correcta transcripción del gen.
- ∂ Un marcador de selección para *P. pastoris*.
- ∂ Secuencia de replicación y selección de *E. coli*.

Dado lo anterior, la clave de la manipulación genética molecular en los organismos es la habilidad para introducir y mantener la secuencia de DNA de interés, por lo cual los vectores tienen que ser mantenidos como elementos de replicación autónomos o integrados en el genoma de *P. pastoris* (Higgins y Gregg., 1998). Los vectores de expresión para *P. pastoris* son en su gran mayoría de tipo integrativo, recombinándose con las zonas homólogas del genoma de la célula asegurando su estabilidad, por lo tanto en el interior del vector de expresión se incluyen zonas homólogas del genoma de *P. pastoris* y así se dirige la clonación a un punto específico de integración en el genoma. Las zonas homólogas más utilizadas en esta levadura son una parte del gen *aox1* o del gen *his4*, correspondiente a la enzima histinol deshidrogenada, el uso de esta última zona (gen *his4*) está limitada a la cepas de *P. pastoris* autotróficas para el aminoácido histidina. Algunos vectores, aparte de incluir el gen *his4* contienen un segundo marcador celular, el gen de la kanamicina o ampicilina, ambos provenientes de *E. coli* que ofrecen resistencia a la droga G418 (Higgins & Cregg, 1998). No obstante, la utilización de este tipo de vectores incrementa la dificultad de la clonación y posterior transformación, ya que la inclusión de *his4* conjuntamente con la resistencia a antibióticos aumenta considerablemente el peso molecular del vector.

Es de gran importancia la construcción de nuestro vector de expresión, debiendo presentar un *cassette* génico constituido por un buen promotor que permita la expresión de nuestra proteína y una secuencia codificadora de una señal de secreción que nos

ayude a una fácil recuperación de esta, además de un marcador para la fácil selección de los clones de expresión. En el caso de *P. pastoris* se ha utilizado habitualmente el promotor del gen *aox1* (P_{AOX1}).

Por otra parte, las tres secuencias señales de secreción más estudiadas son, la ácido fosfatasa, la invertasa y el factor alpha de *S. cerevisiae*; de las anteriores, la más extensamente utilizada para la secreción de proteínas heterólogas desde *S. cerevisiae* y *P. pastoris* es la región prepro del factor alpha ($MF\alpha 1$) frecuentemente utilizada con el promotor $MF\alpha 1$. El precursor del $MF\alpha 1$, el prepro α factor, está codificado por 165 aminoácidos, conteniendo una secuencia señal de 19 aminoácidos que constituyen la región pre y otra la región pro, seguido por 4 repeticiones en *tandem*, de 13 aminoácidos de la frecuencia factor α madura. Cada repetición está precedida por un pequeño “espacio peptídico” con la estructura Lys-Arg-(Glu/Asp-Ala)₂₋₃. El procesamiento del factor α prepro involucra 4 enzimas proteolíticas.

- 1.- La región pre es cortada por la señal peptidasa.
- 2.- La KEX2 proteasa corta en el borde del carboxilo terminal de la secuencia Lys-Arg en la región pro y en la unión de cada repetición.
- 3.- La STE13, una dipeptidylaminopeptidasa, elimina los espacios residuales del amino terminal de cada repetición
- 4.- La KEX1 carboxipeptidasa elimina los residuos Lys y Arg del extremo carboxil de las primeras tres repeticiones.

El requerimiento más importante para la secreción de proteínas heterólogas y el buen funcionamiento del factor α , es la glicosilación de la proteína a secretar, lo que restringiría el uso del factor α a la secreción de proteínas en sistemas de expresión eucariontes.

No menos importante en la construcción de nuestro vector tiene que ser el marcador de integración del vector de expresión que nos ha de permitir seleccionar con claridad los clones que hayan integrado el vector. Para ello el uso de antibióticos es algo común, distinguiéndose el tipo de antibiótico y su concentración de acuerdo al vector y al microorganismo con el que se trabaje. Además, el marcador ha de ocupar poco espacio dentro del vector sin dejar de cumplir su importante función, así podremos construir un vector pequeño que permite una mayor eficiencia de transformación, dada la mayor facilidad de penetración en la célula y su integración en el DNA de nuestro sistema de

expresión. Un ejemplo de marcador es la zeocina cuya resistencia esta conferida por el gen *sh ble* extraído de *Streptoalloteichus hindustanus*; este gen es de tamaño muy pequeño 375 pb y codifica para una proteína de 13.665 Da. La resistencia conferida por el gen *sh ble* es aplicable tanto en *E. coli* como en levaduras (incluyendo *P. pastoris*), como a otros eucariontes. La zeocina es un compuesto tipo bleomycina que mata las células introduciéndose y fraccionando el DNA cromosomal.

Estas características unidas a las que ofrecen los sistemas de expresión en levaduras y la existencia de un kit comercializado por *Invitrogen Co.* han hecho que el número de trabajos con *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas heterólogas haya aumentado espectacularmente y sea un candidato ideal para la expresión de proteínas de interés industrial y académico (más de 400 hasta el momento) (Cereghino y Cregg, 2000), este considerable número de proteínas heterólogas expresadas en *P. pastoris* es además de diversa naturaleza, ya que se han expresado proteínas de virus, de bacterias, de levaduras y de hongos, de plantas, de invertebrados, de vertebrados no humanos y de humanos (Cos., 2005).

2.13.4.- Cepas de expresión.

Todas las cepas de *Pichia pastoris* utilizadas para la expresión de proteínas heterologas provienen de la cepa NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL). Esta cepa tiene una mutación en el gen histinol deshidrogenasa (*his4*), por el cual su crecimiento en medios mínimos o sintéticos requiere un suplemento de histidina. Su auxotrofia por la histidina se indica con el símbolo *his⁻*, por el contrario, en el caso que el mismo microorganismo sea capaz de sintetizar este aminoácido se indica como *his⁺*.

Como ya se ha dicho, los vectores más comunes para la inclusión del gen de la proteína deseada al interior del microorganismo son dirigidos mediante la inclusión de zona homologas del *his4* o *aox1* de *P. pastoris*. Si se utiliza un vector con *his4*, se puede seleccionar las cepas correctamente transformadas por la reversión de su auxotrofia para la histidina, es decir, que quedan como *his⁺*.

La utilización del vector de expresión, usando la región 3' del gen que codifica la *aox1* como una zona homóloga puede comporta en algunos casos la delección del gen de la alcohol oxidasa.

En el caso que haya una delección del gen *aox1* se cambia por completo el comportamiento de la cepa de *P. pastoris* cuando se utiliza metanol como única fuente

de carbono, ya que se disminuye en un 90% la cantidad de AOX presente en el interior de la célula. Solo está operativa la aportación de AOX2, haciendo que la metabolización del metanol por parte de la nueva cepa sea mucho más lenta. Las cepas con esta característica son conocidas con el acrónimo Mut^s (**M**ethanol **u**tilization **s**low). Si por el contrario, la inserción del vector al interior del genoma no implica la interrupción del gen *aox1*, ambas enzimas alcohol oxidasa (AOX1 y AOX2) están operativas denominándose a la cepa Mut⁺ (**M**ethanol **u**tilization **p**lus).

El comportamiento de las dos cepas es exactamente idéntico cuando se utiliza una fuente represora de la expresión de AOX como la glucosa o glicerol. Ahora bien, si se utiliza el metanol como única fuente de carbono, las diferencias entre las dos cepas, una con el fenotipo Mut^s y el otro fenotipo Mut⁺, son claramente apreciables. Según el fenotipo utilizado varía significativamente la capacidad de metabolizar metanol y en consecuencia, la velocidad específica de crecimiento de *Pichia*.

Comercialmente se pueden encontrar cepas de ambos fenotipos, incluso alguna cepa con fenotipo Mut⁻, que se caracteriza por la supresión de los dos genes de la AOX (*aox1* y *aox2*). Esta última cepa no es capaz de metabolizar el metanol, pero necesita su presencia para la expresión de la proteína de interés ya que igualmente utiliza el promotor de la AOX desactivada (Cregg *et al.*, 1989).

Como se indicó, en las cepas fenotipo Mut⁺ se encuentran los dos genes de la alcohol oxidasa activos, estas cepas crecen sobre metanol con una mayor velocidad de crecimiento que los fenotipos Mut^s y Mut⁻. En la fase final de los cultivos con las cepas con este fenotipo, cultivos de altas densidades celulares que pueden alcanzar valores de biomasa superiores a 100 g/L (peso seco), se pueden dar limitaciones de aporte de oxígeno, lo que puede afectar negativamente la expresión de proteínas recombinantes.

Por otra parte, las cepas fenotipo Mut^s presentan una velocidad de crecimiento específica (μ) menor a la de las Mut⁺. A pesar de lo cual, la deficiencia de uno de los genes *aox* no influye en la inducción del promotor AOX. Sin embargo, el hecho que las cepas Mut^s tengan una μ más bajas facilita el control de la concentración de metanol dentro del bioreactor durante toda la fermentación y minimiza los problemas de aporte de oxígeno, hecho que también ayuda a mejorar los niveles de producción de proteína recombinante.

Es posible incluir múltiples copias del gen deseado en el genoma de *P. pastoris* aumentando teóricamente, la cantidad de proteína producida cada vez que se realice una transcripción. El mecanismo para obtener una cepa de este tipo se basa en una

repetición de la inserción del plásmido en la zona homóloga 3' contiguo al gen de la AOX. Esta modificación se puede realizar igualmente para los dos fenotipos posibles (Mut⁺ y Mut^s).

La expresión de las proteínas heterólogas bajo el control del promotor del gen de la AOX, el P_{AOX1}, puede ser afectada por una multitud de factores. Algunos de ellos son intrínsecos del sistema de expresión, como por ejemplo el tipo de fenotipo seleccionado (Mut⁺, Mut^s o Mut⁻), la localización de la inserción dentro del genoma, el número de copias del gen externo o si la expresión es intra o extracelular. También son importantes la cantidad y el tipo de modificaciones post-traduccionales y la estabilidad de su mRNA (Gellisen G., 2000).

Por otra parte, los parámetros físicos como la temperatura, la agitación o la aeración también tienen un efecto directo sobre el Novell de expresión, así como la composición del medio, el pH o la fuerza iónica del mismo.

Otro factor de importancia significativa, para conseguir unos buenos niveles de producción de la proteína de interés, es el tipo de estrategia de cultivo seleccionada y en que momento se ha de comenzar la inducción de la expresión de la proteína.

No se ha demostrado, ni se cree posible encontrar una combinación de estas variables que sean genéricas para cualquier proteína heteróloga bajo el control de P_{AOX1} en *P. pastoris*. Como se ha podido observar después de revisar numerosa bibliografía, parece ser que la naturaleza de la proteína heteróloga es la que determina con más fuerza cuales son las condiciones óptimas de producción. Para encontrar las condiciones ideales de expresión, aún se tiene que realizar de forma empírica. No obstante, sí se conocen una serie de generalidades que pueden orientar a la hora de producir la proteína heteróloga de interés.

2.13.5. Estrategias de producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*.

Es común encontrar en la mayoría de los estudios de expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* bajo el control transcripcional de P_{AOX1}, la utilización de la estrategia de cultivo semicontinuo (*fedbatch*). En prácticamente todos ellos, se comienza con una primera etapa en discontinuo con una fuente de carbono represora de la expresión de la proteína (habitualmente glicerol o glucosa) con el único objetivo de generar una gran cantidad de biomasa de forma rápida. En esta etapa el comportamiento de las cepas con diferente fenotipo (Mut⁺, Mut^s y Mut⁻) es idéntico.

A continuación, se induce la producción de la proteína con la adición de metanol al medio. La presencia de metanol como una única fuente de carbono y energía implica la activación del P_{AOX1} para conseguir elevados niveles de expresión de la proteína alcohol oxidasa (para la asimilación del metanol), y del gen heterólogo deseado clonado bajo el mismo promotor. Es en este apartado donde se encuentran las principales diferencias entre los diferentes estudios que demuestran que según el tipo de metodología se pueden obtener resultados muy diferentes.

El volumen y la frecuencia de adición del metanol determinaran en muchos casos la aparición y acumulación de metabolitos secundarios tóxicos (como el formato o formaldehído). El mismo metanol, también tiene un efecto tóxico sobre *P. pastoris* a partir de concentraciones superiores a los 8 g/L, por lo tanto, se ha de evitar su acumulación en el medio. Evidentemente, el tipo de adición vendrá fuertemente condicionado por la capacidad de asimilación de metanol de la cepa de *P. pastoris* seleccionada, es decir, por su fenotipo Mut.

2.13.6. Proteínas expresadas en *Pichia pastoris*.

En el año 2000, eran ya más de 400 tipos de proteínas heterólogas expresadas con éxito en *P. pastoris*, (Cereghino *et al.*, 2000). Este número de ha incrementado enormemente durante los últimos años, particularmente por el uso de *P. pastoris* como sistema de expresión en diversos programas de genómica estructural (Solà *et al.*, 2007). Es de destacar que por encima del elevado número de proteínas expresadas, se encuentra la gran diversidad, encontrándose un amplio registro de naturaleza muy diversa, desde proteínas virales hasta humanas, pasando por proteínas de bacterias, levaduras, hongos, plantas, animales invertebrados y vertebrados. Ejemplos de esta diversidad se pueden apreciar en la Tabla 2.4.

La lista de proteínas expresadas en *P. pastoris* crece actualmente de forma exponencial, ya que este sistema de expresión se ha convertido en un sistema de referencia en el mundo académico de la investigación y la industria, gracias a sus ventajas ya indicadas. La cantidad de proteína producida en cada caso depende de numerosas variables, comenzando por el tipo de proteína expresada, pudiendo oscilar desde unos pocos microgramos hasta varios gramos por litro de cultivo.

Tabla 2.4.- Ejemplos de proteínas expresadas en *P. pastoris*, clasificadas según su origen.

Proteína	Tipo de expresión I = Intracelular E = Extracelular	Cantidad producida	Referencia
Virus			
Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1	E	20 mg/L	Scorer <i>et al.</i> , 1993
Antígeno de superficie de la hepatitis B	I	400 mg/L	Baer <i>et al.</i> , 2003
Bacterias			
Fragmento C de la toxina del tétanos de <i>Clostridium tetani</i>	I	12 g/L	Clare <i>et al.</i> , 1991
Pertactina de <i>Bordetella pertussis</i>	I	3 g/L	Romanos <i>et al.</i> , 1991
Antígeno SAG1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	E	12 mg/L	Biemans <i>et al.</i> , 1998
Alfa-amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	E	2,5 g/L	Montesino <i>et al.</i> , 1998
Ácido fosfatasa de <i>Escherichia coli</i>	E	28,9 U/mg	Rodriguez <i>et al.</i> , 1999
Levaduras y hongos			
Invertasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	E	2,5 g/L	Tschopp <i>et al.</i> , 1987
Lip1 de <i>Candida rugosa</i>	E	150 U/mL	Brocca <i>et al.</i> , 1998
Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>	E	200 U/mL	Minning <i>et al.</i> , 1998
Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	E	1,6 g/L	Boyle <i>et al.</i> , 1998
Lip4 de <i>Candida rugosa</i>	E	100 mg/L	Tang <i>et al.</i> , 2001
Lip2 de <i>Candida rugosa</i>	E	1095 U/mg	Lee <i>et al.</i> , 2002
Lipasa de <i>Kurtzmanomyces</i> sp.	E	46 U/mL	Kakugawa <i>et al.</i> , 2002
Lip3de <i>Candida rugosa</i>	E	687 U/L	Chang <i>et al.</i> , 2006
Plantas			
Hidroxinitrilo liasa de <i>Hevea brasiliensis</i>	I	22 g/L	Hasslacher <i>et al.</i> , 1997
Nitrato reductasa de espinaca	I	420 mg/L	Mertens <i>et al.</i> , 2000
Invertasa de <i>Ipomoea batatas</i>	E	4 g/L	Huang <i>et al.</i> , 2003
Invertebrados			
Proteína de la seda de araña	I	663 mg/L	Fahnestock <i>et al.</i> , 1997
Proteína olfativa de abeja	E	0,2 mg/L	Danty <i>et al.</i> , 1999
endo- β -1,4-glucanasa de <i>Ampullaria crosseana</i> (molusco)	I	15,31 U/mg	Guo <i>et al.</i> , 2008

Vertebrados (no humana)			
β -caseína bovina	I	1 g/L	Choi <i>et al.</i> , 1996
Albúmina de gato	E	3,3 mg/L	Ree <i>et al.</i> , 1999
α -tropomyocina de gallina	I	20 mg/L	Hilario <i>et al.</i> , 2001
Proteína anticongelante II de pez raya	E	36 mg/L	D'Anjou <i>et al.</i> , 2001
Pepsinogeno de cerdo	E	30 mg	Yoshimasu <i>et al.</i> , 2002
α -bungarotoxina de <i>Snake venom</i>	E	2 mg/L	Levandoski <i>et al.</i> , 2000
Hormona del crecimiento de <i>Ailuropoda melanoleuca</i> (oso panda)	E	100 mg/L	Xu <i>et al.</i> , 2008
Vertebrados (humana)			
Factor de necrosis tumoral	I	10 g/L	Sreekrishna <i>et al.</i> , 1989
Lipasa pancreatica	E	75 mg/L	Yang <i>et al.</i> , 1998
Lisozima	E	300 mg/L	Oka <i>et al.</i> , 1999
Colageno tipo I	I	0,5 g/L	Mokelainen <i>et al.</i> , 2001
Insulina	E	1,5 g/L	Wang <i>et al.</i> , 2001
CD81 Humano	E	1,75 mg/L	Jamshad <i>et al.</i> , 2008

2.14.- Producción de lipasas *C. rugosa* en forma heteróloga.

Dado el problema de obtención eficiente de cada una de las isoenzimas de las lipasas de *C. rugosa* por aproximaciones clásicas, se ha trabajado por parte de diversos grupos en la obtención independiente de cada una de las isoenzimas mediante la tecnología del DNA recombinante. No obstante, la expresión de las lipasas *C. rugosa* en sistemas de expresión convencionales (*E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. pastoris*) supone una dificultad que ha demostrado ser insalvable debido tanto a la alta frecuencia de uso del codón CUG para serina, como a la posición de estas serinas en lugares clave para el mantenimiento de la estructura tridimensional y la actividad catalítica (Mileto *et al.*, 1998).

Como consecuencia, para lograr la expresión funcional de los genes *lip* de *C. rugosa* en microorganismos hospedadores convencionales ha sido necesario modificar en algunos casos por mutación de sitio dirigido los tripletes de los codones “no universales” del gen de la lipasa, de los 45 que codifican para serina (Tang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2006) o bien sintetizar de nuevo el gen cambiando los codones por codones de uso común para serina en el sistema de expresión (Brocca *et al.*, 1998); ambas estrategias se basan en el uso de la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Recurriendo a estas dos estrategias

genéricas, dos grupos de investigación han logrado expresar cuatro de los genes de la familia *lip* en *P. pastoris*: *lip1* (Brocca *et al.*, 1998), *lip4* (Tang *et al.*, 2001), *lip2* (Lee *et al.*, 2002), y *lip3* (Chang *et al.*, 2006), orden cronológico de expresión recombinante, las enzimas recombinantes Lip4, Lip2 y Lip3 han sido expresadas en el mismo huésped por el mismo grupo de investigación.

Otra estrategia explorada se basa en la expresión heteróloga de genes *lip* en huéspedes que tengan un uso de codones similar a *C. rugosa*. Esta estrategia se exploró con éxito relativo para *lip1*, en *Candida maltosa* (Mileto *et al.*, 1998). Sin embargo, esta estrategia presenta limitaciones importantes relacionadas con la escasa disponibilidad de herramientas genéticas (vectores, cepas, etc.) para *C. maltosa* y problemas de estabilidad genética (Lotti, M., datos no publicados).

2.14.1.- Expresión heteróloga de *lip1*.

La estrategia seguida para la expresión recombinante de *lip1* (Lotti *et al.*, 1994^a), fue expresar en *S. cerevisiae* tanto el gen original como el resultante de reemplazar aproximadamente el 50% de los tripletes CUG para restablecer las serinas en aquellas posiciones que creían importantes para la actividad enzimática, a juzgar por la estructura 3D de la lipasa. En ambos casos, la secreción fue posible únicamente cuando la secuencia señal de secreción endógena de la lipasa se sustituía por la presecuencia de la subunidad de la toxina *killer* de *Kluyveromyces lactis*.

Debido a los pobres resultados obtenidos en término de calidad del producto heterólogo por el equipo de Lotti, se procedió en colaboración con el grupo del Profesor R. Schmid de la Universidad de Stuttgart, a realizar una estrategia diferente consistente en sintetizar *in vitro* el gen completo de la lipasa Lip1 eliminando todos los tripletes CUG no-universales. El gen sintético fue insertado en plásmidos adecuados para la expresión en *P. pastoris* y *S. cerevisiae*. Los autores investigaron la influencia de la secuencia señal de la expresión de la lipasa y para ello fusionaron el gen sintético tanto con la presecuencia original de *C. rugosa* como con las pre- y preprosecuencias de la subunidad de la toxina *killer* de *K. lactis*. Los mejores niveles de expresión se obtuvieron con el gen fusionado a la preprosecuencia de la toxina de *K. lactis* expresado en *P. pastoris*. La lipasa secretada se obtenía en su forma glicosilada, correctamente procesada y activa, siendo sus propiedades moleculares y catalíticas similares a las de la lipasa nativa (Brocca *et al.*, 1998).

2.14.2.- Expresión heteróloga de *lip4*.

El grupo de Tang y colaboradores logró la expresión del gen *lip4* en dos microorganismos hospedadores: *E. coli* (Tang *et al.*, 2000) y *P. pastoris* (Tang *et al.*, 2001) siguiendo la estrategia de reemplazar, mediante mutagénesis dirigida, los 19 tripletes CUG del gen por otros universales para serina. La secuencia del gen *lip4* modificada fue insertada en un plásmido con el promotor del gen GAP (que codifica la gliceraldehido-3fosfato deshidrogenasa de *P. pastoris*) el cual fue transformado en *P. pastoris*, lograndose así la expresión constitutiva de Lip4. En el primer organismo, la lipasa fue expresada aunque mayoritariamente como cuerpos de inclusión, que sometidos a procesos de solubilización y renaturalización, produjeron lipasa con actividad específica basal, mejorando los niveles de expresión al fusionar el gen mutado de *lip4* con el de la tioredoxina formando el gen TrxFus-*lip4*, de tal forma que se logró obtener la lipasa soluble y activa en el citoplasma de *E. coli* AD494(DE3). El hecho que esta lipasa fuese expresada en su forma no glicosilada (dado que éste organismo es procariota), explicaría la baja actividad específica observada para esta forma de lipasa recombinante.

Por otro lado, Tang y colaboradores en 2001, expresaron el gen *lip4* mutado en *P. pastoris* obteniendo la forma glicosilada de la lipasa en su medio de cultivo. La secreción de la enzima en el medio de cultivo facilitó la purificación de la lipasa heteróloga comparado con la expresada en el citoplasma de *E. coli*. La disponibilidad de formas glicosiladas y no glicosiladas de la lipasa Lip4 (producidas en *P. pastoris* y en *E. coli*, respectivamente), permitió comparar ambas a distintos niveles, observando que si bien, no se apreciaron diferencia significativas respecto a sus propiedades catalíticas, mostrando una alta actividad esterásica para los esteres de cadena larga C16 y C18, y un alto nivel de actividad lipásica sobre lípidos insaturados de cadena larga; por otra parte, la estabilidad térmica pasó de los 52 °C en la forma no glicosilada (expresión en *E. coli*) a los 58 °C en para la forma glicosilada (expresión en *P. pastoris*) (Tang *et al.*, 2001).

Estos trabajos de Tang y colaboradores en el 2000 y 2001, aparte de la expresión y caracterización de Lip4, permitieron su comparación con Lip1, lipasa con quien presenta alta homología en su secuencia; indicando que a diferencia de Lip1, Lip4 no muestra activación interfacial por los substratos lipídicos tributirina y trioleina, con ello se distingue diferencias en la actividad catalíticas entre ambas enzimas.

2.14.3.- Expresión heteróloga de *lip2*.

La expresión recombinante de *lip2* en *P. pastoris*, fue lograda por Lee y col., en 2002 siguiendo la estrategia de mutagénesis múltiple de los codones no universal de serina para *C. rugosa*, estrategia análoga a la desarrollada para la síntesis y expresión del gen *lip4* por Tang *et al.*, 2001. A la secuencia codificante de la proteína madura se le realizó mutación dirigida para reemplazar los 19 codones CUG no universales que son leídos por *C. rugosa* como serina, por codones universales de serina (UCU), insertada en un plásmido con el promotor del gen GAP (que codifica la gliceraldehido-3fosfato deshidrogenasa de *P. pastoris*) el cual fue transformado en *P. pastoris*. De esta forma se logró la expresión extracelular de Lip2 funcional. Este desarrollo experimental de producción se realizó solo a nivel de matraces.

2.14.4.- Expresión heteróloga de *lip3*.

La expresión recombinante de *lip3* en *P. pastoris*, fue lograda por Chang y col., en 2006 siguiendo la estrategia de mutagénesis dirigida múltiple de los codones no universal de serina para *C. rugosa*, estrategia análoga a la desarrollada para la síntesis y expresión del gen *lip4* y *lip2* realizadas por Tang *et al.*, 2001 y Lee *et al.*, 2002, respectivamente. Se modificaron los 18 codones no universales codificantes para serinas del gen *lip3* en *C. rugosa*, por 18 codones universales codificantes para serinas del gen *lip3* en *P. pastoris*, el nuevo gen fue insertado en el vector pGAPZ α C y transformado en *Pichia*.

3.-Objetivos

3.-Objetivo General:

El objetivo general del presente estudio es la obtención de la isoenzima Lipasa 2 (Lip2) recombinante de *Candida rugosa* mediante sistema de expresión de *Pichia pastoris*, su caracterización bioquímica y funcional, incluyendo su estabilidad, y su aplicación en biocatálisis, más concretamente, en la resolución de mezclas racémicas para obtener productos enantioméricos puros de interés para la industria farmacéutica.

El planteamiento de este objetivo general se debe a la presencia de diferentes isoenzimas en las lipasas comerciales de *Candida rugosa* que pueden afectar a la reproducibilidad de los resultados en los procesos biocatalíticos donde se aplican dependiendo del lote y origen del mismo. La homología entre estas isoenzimas hace no viable, desde el punto de vista industrial, su purificación debido a los bajos rendimientos que se obtienen, siendo la producción heteróloga de Lip2 una opción posible para evitar este problema.

Objetivos parciales:

- 3.1) Diseñar la secuencia nucleotídica de *lip2* que permita la expresión del gen *lip2* recombinante en *P. pastoris* sin errores de traducción, para los aminoácidos serina y la adaptación global del uso de codones de *Candida rugosa* a *Pichia pastoris*.
- 3.2) Síntesis del gen *lip2*. Para ello hay que adaptar el codón de aminoácidos para serina de *Candida* a *Pichia*, debido a que *Candida* posee un código genético no universal para el aminoácido serina y la optimización del uso de codones para su expresión funcional en *Pichia* y *E. coli*.
- 3.3) Subclonaje del gen sintético *lip2*, inicialmente clonado en el plásmido pUC19 de *E. coli*, al vector de expresión pPICZ α para obtener así el vector pPICZ α *lip2* bajo el control transcripcional del promotor AOX en una cepa de *Pichia pastoris* de fenotipo Mut⁺. Selección de los clones transformantes productores de rLip2 en cultivos en matraces Erlenmeyer.

- 3.4) Optimización de las condiciones de fermentación en cultivos en discontinuo.
- 3.5) Producción de la Lip2 recombinante en cultivos en discontinuo alimentado a elevadas densidades celulares a escala birreactor de laboratorio (5 litros).
- 3.6) Diseño del proceso de separación y purificación de la rLip2 producida.
- 3.7) Caracterización bioquímica y funcional del productor recombinante.
- 3.8) Evaluación del proceso de inmovilización de la isoenzima.
- 3.9) Estudio de la estabilidad de la rLip2 y comparación con la Lip2 nativa y otras isoenzimas de *Candida* producidas de forma recombinante tanto en solución como inmovilizada.
- 3.10) Aplicación de la rLip2 en la resolución de mezclas racémicas de antiinflamatorios no esteroideos e intermediarios quirales de interés en la industria farmacéutica en reacciones de síntesis en medio orgánico.

4.-Materiales y métodos

4.1.- Cepas y medios de cultivo.

Se utilizaron tres cepas en el curso de los diferentes experimentos: la cepa de la eubacteria *Escherichia coli* DH5 α [F^- *end* A1 *hsdR17* (rk^- , mk^+) *sup* E44 *thi^-* λ^- *gyrA96 relA1* Δ (*argF lacZya*)U169] para amplificar los distintos plásmidos construidos. Para la expresión de la proteína rLip2 en *Escherichia coli* (*E. coli*) se utilizó la cepa *E. coli* BL21 (DH3). *E. coli* fue cultivada en todos los casos en Erlenmeyers a 37° C a 200 rpm en medio LB (Tabla 4.1). La levadura *Pichia pastoris* X33 (fenotipo salvaje, Mut $^+$; esta cepa es isogénica a la cepa autotrófica para histidina GS115, Invitrogen, en la cual se revirtió su auxotrofia, ref. *Pichia* protocols) se cultivó en Erlenmeyers en medio YPD (Tabla 4.2) para crecimiento celular y BMM (Tabla 4.3) para inducción de la producción de la proteína en cultivos de pequeña escala. Para los cultivos en biorreactores discontinuos se utilizó medio BMM (Tabla 4.3); para los cultivos en biorreactores discontinuos alimentados se utilizó medio Invitrogen (Tabla 4.4 y 4.5), se prepararon soluciones stock tanto para biotina (500X, con una concentración de 400 mg/L), como para el antiespumante J673 (Strucktol ref. 02041) (stock 1000 X, concentración de 10mg/L); el cultivo inóculo para las diferentes fermentaciones se cultivó en Erlenmeyers en medio YPD.

Tabla 4.1.- Medio de cultivo LB para *E. coli*

Reactivo	concentración (g/L)	Proveedor	Referencia
Triptona	10	OXOID	LP0037
Extracto de levadura	5	OXOID	L0021
NaCl	10	Panreac	121659
Agar-agar (al realizar placas)	20	OXOID	LP0011

Al medio LB se le adicionan 50 μ g/mL de Zeocina para seleccionar los transformantes de *E. coli*, en estos casos no se le agrega NaCl al medio.

Tabla 4.2.- Medio de cultivo YPD para *P. pastoris*

Reactivo	Concentración (g/L)	Proveedor	Referencia
Glucosa	20	Quimivita	GI/0045 QP
Peptona	20	OXOID	L-37
Extracto de levadura	10	OXOID	L-21
Agar-agar (al realizar placas)	20	OXOID	LP0011

Para el medio YPD la glucosa se autoclave por separado para evitar su caramelización, luego se mezclan las soluciones alcanzando el volumen deseado. Se le adicionan zeocina (100 μ g/mL) para seleccionar los transformantes deseados.

Tabla 4.3.- Medio de cultivo BMM para *P. pastoris*, se indica la cantidad de reactivo en peso ó volumen por litro de solución.

Reactivos	Peso o volumen (g ó mL)	proveedor	Referencia
Tampón fosfato de potasio 1 M	100 mL		
(NH ₄) ₂ SO ₄ (1M)	100 mL	Panreac	141140
Metanol	10 g	Panreac	161091
YNB (Yeast Nitrogen Base w/o aa and amonium)	1,34% (p/v)	Difco	223054
H ₂ O	800 mL		

La concentración de metanol se regula de acuerdo al objetivo de la experiencia. Medio esterilizado por filtración (diámetro de poro 0.22 µm). El tampón fosfato se prepara mezclando K₂HPO₄ (Panreac, ref. 132333) y KH₂PO₄ (Panreac ref. 141509) ambos 1M, la mezcla se realiza partiendo de la solución de KH₂PO₄ y añadiendo K₂HPO₄ hasta alcanzar el pH deseado.

Tabla 4.4.- Medio de cultivo Invitrogen para *P. pastoris*

Reactivos	concentración (g/L)	Proveedor	Referencia
Sales base del medio			
KH ₂ PO ₄	13,2	Panreac	141509
K ₂ HPO ₄	hasta pH 6,5	Panreac	132333
CaSO ₄	0,93	Panreac	121253
MgSO ₄ * 7H ₂ O	4,7	Panreac	131404
K ₂ SO ₄	18,2	Panreac	141532
KOH	4,13	Panreac	141515
H ₃ PO ₄ (85%)	26,7 mL	Panreac	131032
NH ₄ OH (30%)	Control de pH	Panreac	141130
Fuentes de carbono			
Glicerol	20 ó 40	Panreac	141339
Metanol		Panreac	161091
Biotina 500 X	1 mL por litro	Sigma	B4501
Solución sales traça (X 1000)	2 mL por litro		

Tabla 4.5.- Solución sales traza ($\times 1000$) para el medio de cultivo Invitrogen para *P. pastoris*.

Reactivos	concentración (g/L)	Proveedor	Referencia
CuSO ₄ * 5H ₂ O	6,0	Merck	2790
NaI	0,08	Panreac	141726
MnSO ₄ * 4H ₂ O	3,0	Panreac	131413
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,2	Panreac	141701
H ₃ BO ₃	0,02	Panreac	131015
FeSO ₄ * 7H ₂ O	65,0	R. Haen	31236
CoCl ₂	0,5	Merck	2539
ZnCl ₂	20,0	Panreac	141779

El medio de cultivo Invitrogen fue esterilizado por autoclave, añadiendo al final las sales minerales trazas que también son autoclavadas y la solución de vitamina (biotina) que fue esterilizada por filtración (diámetro de poro 0,22 μm).

Todos los medios de cultivo, el biorreactor Braun Biotech International modelo Biostat B y los materiales que así lo requiriesen se esterilizaron por autoclave a 121 °C durante 30 min en un autoclave Varilav 400 (Varioklav, Munich, Alemania), excepto los casos en que se indica expresamente otro sistema de esterilización.

4.2.- Métodos de Biología Molecular.

4.2.1.- Síntesis del gen *lip2* mediante PCR.

La técnica de la PCR (Fig. 4.1) fue desarrollada en 1985 por Kary Mullis y es en la actualidad una de las técnicas de biología molecular más ampliamente usadas (Griffiths *et al.*, 2000). El objetivo de esta técnica es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo, en teoría, de una única copia de ese fragmento. En esencia, la técnica de la PCR sirve para amplificar DNA. Tras la amplificación, resulta sencillo identificar el origen del DNA sea este procedente de virus y/o bacterias, identificar personas o hacer investigación científica sobre el DNA

amplificado o sintetizar un DNA aplicándole las modificaciones deseadas como es nuestro caso. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las DNA polimerasas para replicar hebras de DNA, y usa ciclos de alta y baja temperatura para separar las hebras de DNA recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a la polimerasa para que vuelvan a duplicarlas. Para que la técnica de la PCR funcione se necesita abundante suministro de bases de nucleótidos y dos cebadores, que son secuencias cortas de unos veinte nucleótidos y que se usan para iniciar la reacción de síntesis. En primer lugar, se calienta la mezcla para separar las hebras de DNA (el DNA se desnaturaliza) y a continuación se enfría la solución, lo que permite que los cebadores se unan a las partes adecuadas de la hebra de DNA. Para terminar, se aumenta la temperatura hasta el valor en que puede actuar la polimerasa, y sobre la plantilla crece una hebra nueva complementaria (Fig. 4.1).

La PCR, aparte de ser una técnica para la amplificación y manipulación de secuencias de DNA existentes, también, sirve para la creación de nuevos fragmentos de DNA (Fig. 4.2), partiendo de una secuencia de ácido nucleico determinada. Así, dados una serie de oligonucleótidos con sus secuencias parcialmente complementarias, dichos oligonucleótidos pueden hibridarse parcialmente, y usarse de molde para generar y amplificar un nuevo fragmento de DNA, a través de varios ciclos de amplificación en PCR (ver figura 4.1).

La capacidad para generar *in vitro* un fragmento de DNA tiene variadas aplicaciones. Un ejemplo de estas aplicaciones es la síntesis *de novo* del gen sintético para la proteína Lip2 de *C. rugosa*, donde el diseño de su secuencia nucleotídica se ha basado en el uso de los codones que son preferentemente utilizados en el organismo huésped utilizado para la expresión de la proteína recombinante (*P. pastoris*). Además, se añadieron tres dianas de restricción, *EcoRI*, *NotI* y *Hind III*, (Tabla 4.6) en los extremos del gen diseñado para facilitar así la posterior clonación del fragmento de PCR en un vector plasmídico. No obstante, dado el tamaño de *rlip2*, unas 1600 pb, su proceso de síntesis era complejo y por ello fue realizado por la empresa alemana Biospring.

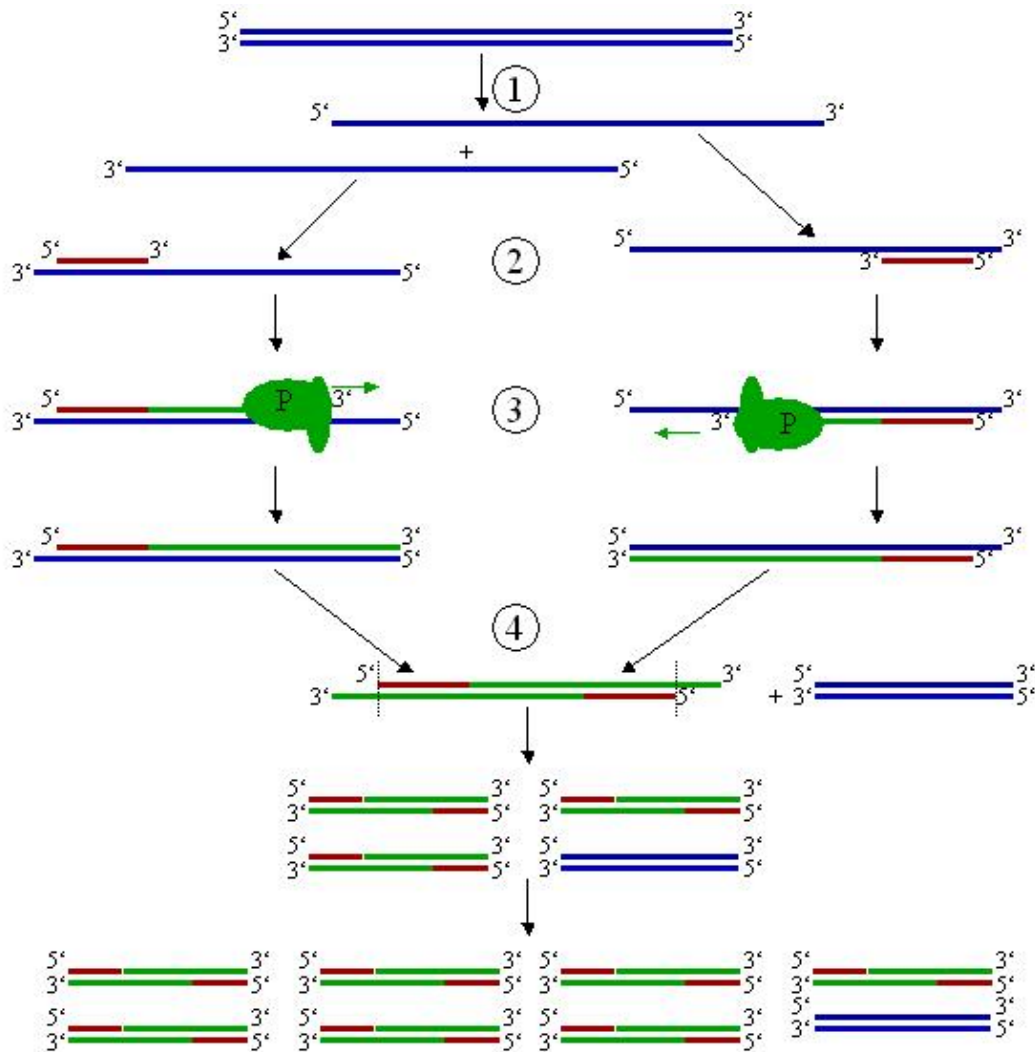


Fig. 4.1. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 1 El DNA que contiene la secuencia diana es desnaturalizado por temperatura. 2 Unión de los cebadores sintéticos (*primers*) cuyas secuencias son complementarias a los extremos 5' y 3' de la secuencia que se desea amplificar. 3 La *Taq* polimerasa sintetiza las primeras cadenas complementarias de la reacción, las dos primeras cadenas tienen un tamaño variable, debido a que carecen de una señal de termino común extendiéndose más allá de la secuencia diana delimitada por los cebadores. 4 Las moléculas de doble cadena se desnaturalizan de nuevo exponiendo cuatro sitios de unión para los cebadores, los dos cebadores vuelven a unirse a la secuencias complementarias en los extremos 3' de la región diana, sintetizando la *Taq* polimerasa dos cadenas complementarias, con la longitud exacta de la secuencia diana, pudiendo repetirse en ciclos indefinidamente obteniendo cada vez un mayor número del tramo doble hebra de la secuencia deseada, e indicada con los cebadores.

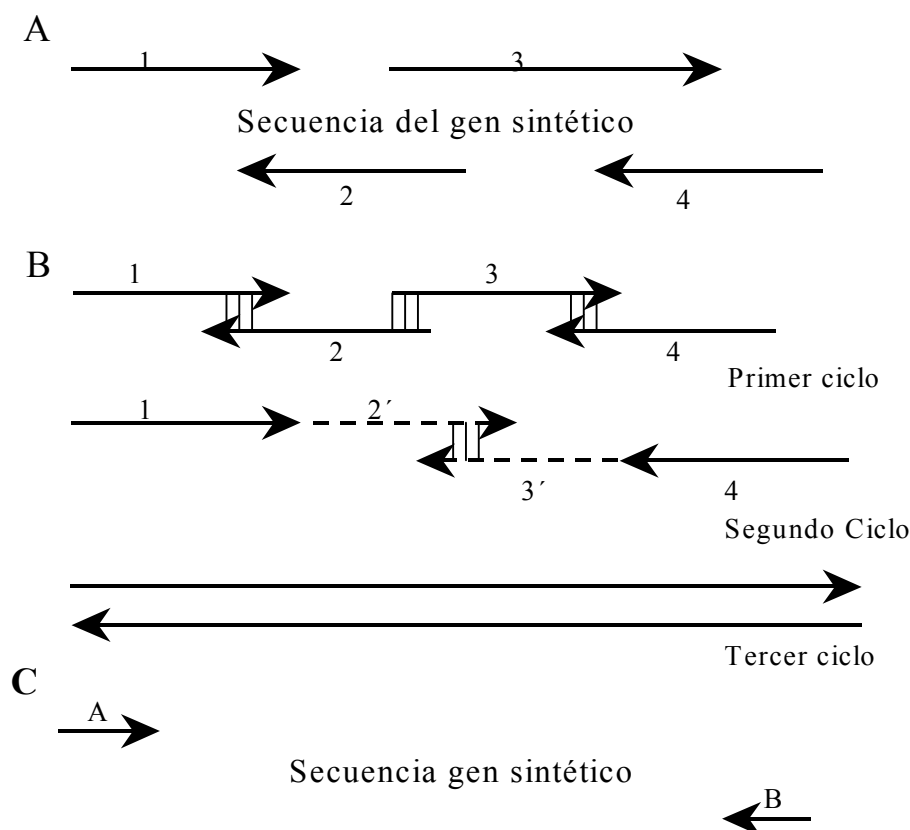


Fig. 4.2.- Descripción en dos pasos del método de PCR para la construcción del gen sintético. A.- Esquema de la orientación de los oligonucleotidos superpuestos para la primera reacción de PCR. B.- Diagrama de extensión de los oligonucleotido durante el ciclo inicial de la primera PCR. C.- Esquema del diseño y orientación de los *primers* de los extremos para la segunda PCR. Adaptado de White, 1993.-

Tabla 4.6.- Enzimas de restricción, su origen y sitios de corte.

Enzima	Origen Bacteriano	Sitio de Reconocimiento	Resultado del Corte
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5' GAATTC 3' CTTAAG	5' ---G AATTC ---3' 3' ---CTTAA G ---5'
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5' AAGCTT 3' TTCGAA	5' ---A AGCTT ---3' 3' ---TTCGA A ---5'
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis</i>	5' GCGGCCGC 3' CGCCGGCG	5' ---GC GGCCGC --- 3' 3' ---CGCCGG CG --- 5'
<i>SalI</i>	<i>Streptomyces albus</i>	5' GTCGAC 3' CAGCTG	5' ---G TCGAC ---3' 3' ---CAGCT G ---5'

La secuencia de DNA correspondiente a la proteína lipasa 2 recombinante (rLip2) fue sintetizada por BioSpring mediante la técnica de PCR. BioSpring clonó el gen *rlip2* en el plásmido pUC19 (Fig. 4.3), obteniendo el plásmido pUC19 $rlip2$ a partir de cultivos de los transformantes de *E. coli* aislados.

4.2.2.- Modificación del DNA plasmídico.

Las reacciones de digestión con *EcoRI*, *NotI* y *SalI* (Tabla 4.6) y de ligación de DNA con ligasa T4 se realizaron con enzimas de la casa Roche Diagnostics siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.3.- Purificación del DNA plasmídico y fragmentos de DNA.

Las extracciones de DNA plasmídico se realizaron con el Plasmid Extraction Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante para Mini- y MidiPrep. El DNA precipitado se resuspendió en 100 μ L de agua miliQ estéril. Para recuperar los fragmentos de DNA de los geles de agarosa se utilizó el Gel Extraction Kit (Qiagen).

La secuenciación del DNA correspondiente a la región de inserción 5' de *lip2* en el plásmido pPICZ α se llevo acabo en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Barcelona utilizando los siguientes cebadores:

5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3' y 3' TCATAGAAGCTTCCTAGGGT 5'

4.2.4.- Subclonación de *lip2* en pPICZ α y transformación de *P. pastoris*.

El plásmido pPUC19*lip2* fue el material de partida para la subclonación en nuestro laboratorio del gen *rlip2* sintético en un vector de expresión de *P. pastoris*, pPICZ α (Invitrogen). Así pues, se cortó la secuencia de DNA correspondiente a *lip2* en el plásmido pUC19 (Fig. 4.3) mediante enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI*, y se insertó por ligación en el plásmido pPICZ α (Fig. 4.4) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, constituyendo de esta manera el plásmido pPICZ α *lip2*. Esta ligación se usó para transformar *E. coli* DH5 α mediante eletroporación, utilizando un electroporador Gene pulser System, BioRad, bajo las condiciones que recomendadas por el fabricante (Tabla 4.7). Ello permitió aislar transformantes resistentes a zeocina en placas de LB-zeocina, y purificar pPICZ α *lip2* a partir de cultivos en Erlenmeyer de los mismos. El plásmido pPICZ α *lip2* purificado se linearizó con la enzima de restricción *SalI* (Tabla 4.6) y mediante electroporación se transformó la levadura *P. pastoris*, y se seleccionaron los transformantes resistentes a zeocina en placas de YPD-zeocina, se ha recordar que en nuestro caso la zeocina es nuestro marcador de transformantes, es decir, que tanto las *E. coli* como las *P. pastoris* transformantes

positivas pasaran a ser resistentes a la zeocina (Fig. 4.5) y de esta manera tenemos una manipulación más precisa de nuestras cepas. La zeocina es un antibiótico de la familia de la bleomicina, la resistencia a este antibiótico esta conferida por el gen *Sh ble* que codifica una proteína de 13.665 Da. En las células que expresan esta proteína, esta se une a la zeocina protegiendo el DNA celular en su proceso de división. La zeocina puede ser utilizada para la selección de líneas celulares de mamíferos, insectos, levaduras y bacterias. La cantidad necesaria para ser utilizada varía entre 50-2000 µg/mL dependiendo de las células a seleccionar, nosotros utilizamos 50 µg/mL, para *E. coli* y 100 µg/mL para *P. pastoris*.

El plásmido pUC19 (Fig. 4.3) es un vector de clonación general para *E. coli*, presenta un origen de replicación para este microorganismo y que le permite su replicación autónoma en *E. coli*. El plásmido pPICZα (Fig. 4.4) es un vector de expresión para *P. pastoris*, que a su vez es un vector lanzadera entre *E. coli* y *P. pastoris*. Se puede replicar de forma autónoma en *E. coli* (pUCori) permitiendo una mejor manipulación y amplificación; al no presentar un origen de replicación funcional en *P. pastoris*, necesariamente se integra en el genoma de *P. pastoris*, al transformar este microorganismo con el pPICZα, concretamente en el locus *aox1*, por recombinación homóloga.

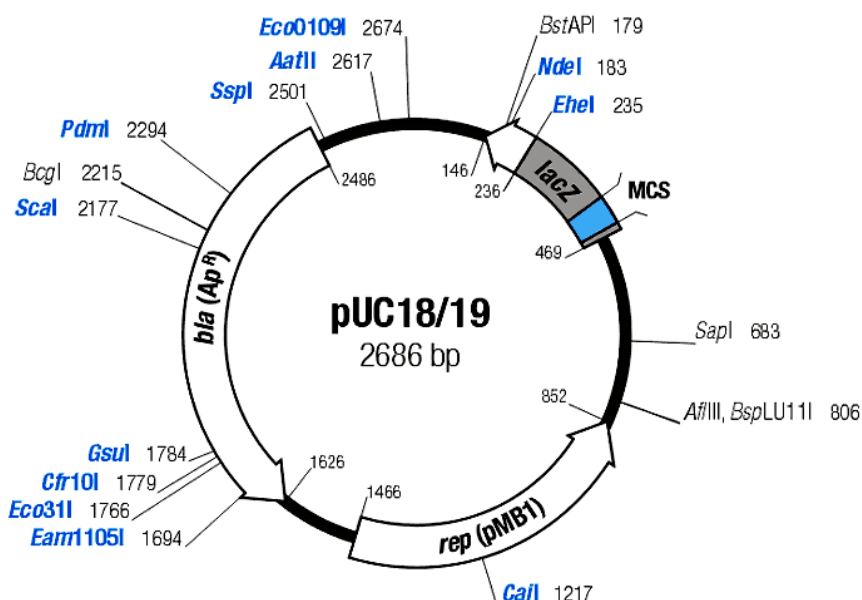


Fig. 4.3.- Estructura del plásmido pUC19. Se aprecian en el esquema la ubicación de las enzimas de restricción, la secuencia pMB1 responsable de la replicación del plásmido, el gen *bla*, que codifica para una beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina, la secuencia del gen *lacZ*, inducible por IPTG y activado por X-gal, como marcador de inserción, ya que en el se encuentra el múltiple clonig sites (MCS). Más información en: <http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappuc1819.htm>

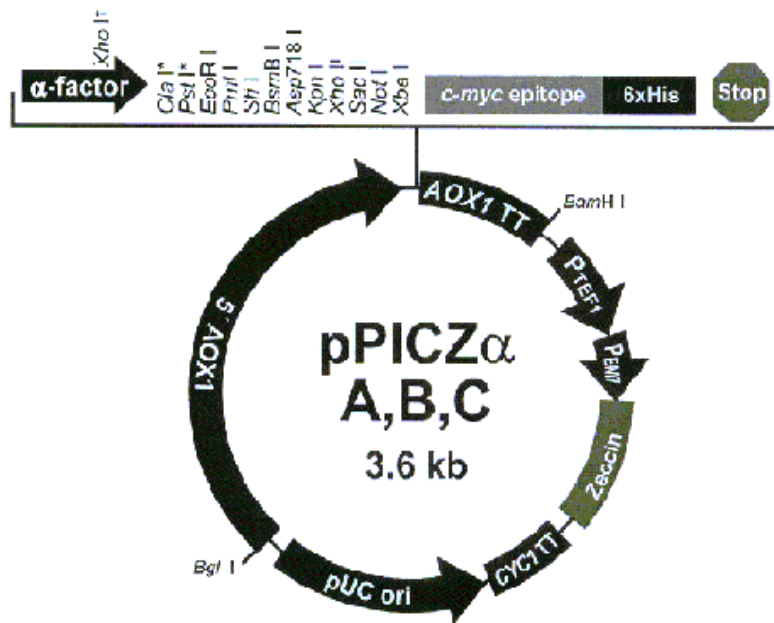


Fig. 4.4.- Estructura del plásmido pPICZ α . Se observa la secuencia señal del factor alfa, las enzimas de restricción, el sitio de clonación, unido a la secuencia codificadora para la cola de histidina y luego la secuencia stop, la secuencia para el promotor AOX1, la secuencia codificadora de resistencia para zeocina, la región de termino de transcripción CYC1 y los promotores TEF1 y EM7, la secuencia para *Sal* I, se encuentra al interior de la secuencia del promotor AOX1, permitiendo una recombinación homologa en *P. pastoris*. Más información en : <http://www.invitrogen.com/search/index.cfm?fuseaction=search.simplesearch&searchterm=pPICZ>

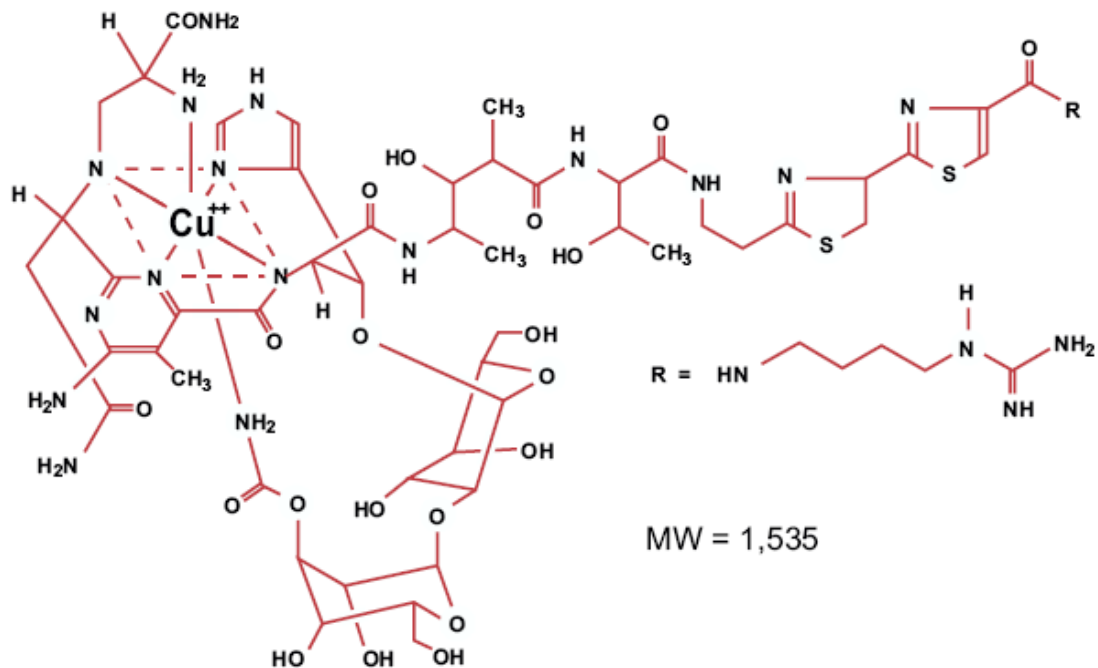


Fig. 4.5.- Esquema molecular de la Zeocina, antibiotico utilizado como marcador de selección tanto para cepas de *E. coli* como de *P. pastoris*.

4.2.5.- Clonación del gen *lip2* para la expresión en *E. coli*.

Para la expresión de *lip2* en *E. coli*, dicho gen se aisló a partir del plásmido pUC19*rlip2*, clonado en *E. coli* DH5 α , mediante una doble digestión enzimática con endonucleasas, *Not* I y *Eco* RI (Tabla 4.6). El fragmento de DNA purificado que contenía el gen *rlip2* se ligó con el vector de expresión pET21 (Novagen) (Fig. 4.6) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. De esta manera se obtuvo el vector pET21*rlip2*. La cepa de *E. coli* BL21 (Novagen) fue transformada con el plásmido pET21*rlip2* mediante electroporación; la resistencia a la ampicilina como marcador nos permitió la selección de transformantes.

4.2.6.- Producción de rLip2 en *E. coli*.

La inducción y producción de la proteína rLip2 se realizó como recomienda el Manual NOVAGEN pET System Manual (http://www.fhcrc.org/science/labs/hahn/methods/biochem_meth/pet.pdf).

1. Se procedió a inocular 8 Erlenmeyers de 2 L de volumen, con 200 mL de LB cada uno, con volumen de 10 mL de un cultivo pre-inoculo de 100 mL de *E. coli* BL21 pET21*rlip2*, se incubo a 37 °C y 250 rpm por 5 horas aproximadamente.
2. Se procedió a esperar que el cultivo se encontrara a una densidad óptica entre 0.5 y 0.8, se realizó inducción mediante IPTG 0.1 mM, inducción por 4 horas, se dispuso el medio de cultivo ocupando un 10% del volumen de los respectivos matraces. Matraces que en todos los casos presentaban deflectores para una mejor aireación del cultivo y con ello un mayor crecimiento.
3. Posterior ha lo cual se procedió a poner el matraz en hielo por 5 min.
4. Se centrifugo 5 min a 5000 x g y se recolectaron las células.
5. Se resuspendieron las células en 0,25 volúmenes (con respecto al volumen inicial) de 20 mM Tris-HCl pH 8,0 (frío) y se volvió a centrifugar.
6. Se almacenó el *pellet* en dos recipientes para los posteriores análisis.

La purificación de la proteína rLip2 producida en *E. coli* (proteína con cola de histidina) se realizo mediante dos técnicas en una resina con afinidad de metales quelados, la primera mediante gradiente de pH en tampón con alta carga de urea y el segundo

mediante imidazol, en ambos caso se realizó el cambio de tampón en gradiente, para así aumentar la capacidad de resolución del método.

Protocolos de purificación de la proteína rLip2 producida en *E. coli*.

1. En ambos casos, se partió con una desnaturalización de las proteínas utilizando 2,5 volúmenes (en relación al *pellet*) de la solución de urea 8M con 20 mM de tampón fosfato de sodio a pH 8,0 por 60 min, trabajando a temperatura ambiente.
2. Se centrifugó el lisado a 10.000 x g por 30 min a temperatura ambiente y se recupero el sobrenadante.
3. La columna de afinidad Histrap (1 ml volumen interno, GE Healthcare) se equilibró con 10 mL de NiSO₄ 0.1 M, posterior a lo cual se lavo con 10 mL con agua destilada.

En cada caso el volumen de carga de las muestras con las proteínas en la columna fue de 5mL.

4.2.6.1.-Purificación por gradiente de pH.

- Se lavó la columna con 3 volúmenes (3 mL) de la solución Urea 8 M con 20 mM de tampón fosfato de sodio a pH 6,5 y se procedió a realizar el gradiente con el tampón de elución (Urea 8 M, 20 mM fosfato de sodio pH 4,5); colectando la elución en cada momento en volúmenes de 2 mL con un caudal de 1 mL/min.

4.2.6.2.-Purificación por gradiente de Imidazol.

- Se lavó la columna con 3 volúmenes (3 mL) de tampón imidazol (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7.4) y se procedió a realizar el gradiente con el tampón de elución (0.5 M NaCl, 500 mM imidazol, 20 mM fosfato de sodio pH 7.4); colectando el volumen de elución en cada momento en volúmenes de 2 mL.

En ambos caso como último paso de purificación se realizo una cromatografía de gel filtración. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un gel, constituido por partículas esféricas homogéneas de gel de dextrano, polímero ramificado de glucosa entrecruzado, que se comercializa con el nombre de SEPHADEX. Este gel se introduce en

una columna como soporte cromatográfico, las bolitas de gel tienen poros de un determinado tamaño en donde las moléculas de pequeño tamaño difunden a través de los poros de las partículas del gel y por ello son retenidas en su paso por la columna y se retarda su elución. Las moléculas grandes no entran en los poros de las partículas del gel y por ello eluyen rápidamente en lo que se denomina volumen de exclusión de la columna. De esta forma, las moléculas se separan en función de su tamaño, eluyendo en orden decreciente de peso molecular. Cada gel presenta poros de distinto tamaño en nuestro caso usamos Sephadex G-75, que separa moléculas entre 3.000 y 70.000 Da, las moléculas mayores de 70.000 Da no pasará a través de los poros de las esferas.

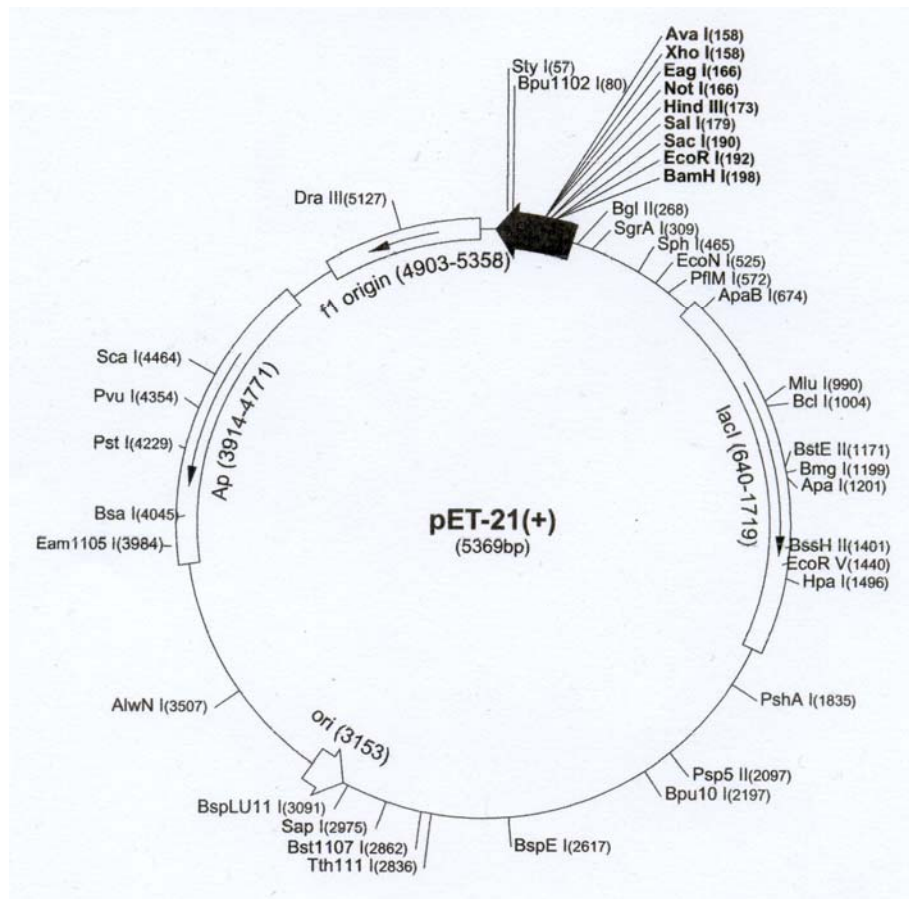


Fig 4.6.- Estructura del plásmido pET21. Se aprecia en la estructura del plásmido el *multiple cloning site* delimitado por las secuencias para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I(158-203); presenta la secuencia ATG de inicio y una secuencia codificadora His*Tag terminal (140-157), se aprecia el sitio de origen f1(4903-5358) y el sitio *ori* (origen pBR322), la secuencia codificadora *bla*, que otorga resistencia a la ampicilina y la secuencia *lacI* (640-1719) para la inducción de la producción de la proteína recombinante. Más información en : www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB063.pdf

4.2.7.- Electroforesis de DNA.

Las electroforesis en geles de agarosa se realizaron según el protocolo de Sambrook *et al.*, 1992. Para separar los fragmentos de DNA por su peso molecular se prepararon geles al 0.8% (p/v) de agarosa (Sigma ref. 05077). Utilizando tampón TAE (40 mM Tris·HCl, 20mM ácido acético, 2 mM EDTA, pH 8.3) como tampón de corrida de electroforesis. Como tampón de carga se utilizó una solución de glicina 30% (p/v), azul de bromofenol 0.2% (v/v), EDTA 25 mM, pH 7.5. El gel de agarosa se preparó con un 0,01% v/v de bromuro de etidio para visualizar las bandas y se fotografió con un equipo *Electrophoresis Documentation and Analysis System 120* (Kodak) y el *ID Image Analysis Software* (Kodak). Como marcador de peso molecular se utilizó una preparación de 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen) al 10% (v/v), 70% H₂O y tampón de carga al 20% (v/v).

4.2.8.- Transformación de *E. coli* y *P. pastoris*.

4.2.8.1- Transformación de *E.coli*.

Preparación de células competentes de *E.coli*

1. Cultivar durante toda la noche de células DH5 α en medio LB
2. Inocular 20 mL de medio 2x YPD con 0,2 mL del cultivo de toda la noche, dejar en agitación a 37 °C hasta llegar a una DO₅₅₀ de 0.6.
3. Repartir en dos tubos de 10 mL y centrifugar 10 min a 5000 rpm a 4 °C.
4. Decantar el sobrenadante y resuspender las células en 2 mL de H₂O_{miliQ} estéril.
5. Añadir glicerol estéril hasta el 10% del volumen
6. Hacer alícuotas de 50 ó 100 μ L en condiciones estériles y congelar a -80 °C.

Electrotransformación de *E. coli*

7. Poner 0,5 mL de medio LB a 37 °C para la transformación y descongelar en frío la alícuota de células competentes a utilizar.
8. Agitar suavemente y en frío de 1 a 5 μ L de DNA ligado y las células electrocompetentes.
9. Transferir las células y el DNA a una cubeta de electroporación, previamente enfriada en hielo y aplicar un pulso de corriente según recomendaciones del fabricante del electroporador para *E. coli* Tabla 4.7.

10. Retirar la cubeta de la cámara de electroporación y añadir inmediatamente 0.5 mL de medio LB previamente calentado a 37 °C y resuspender suavemente las células.
11. Transferir por decantación las células a un tubo eppendorf estéril e incubar durante 1 h a 37° C sin agitación.
12. Sembrar con rastrillo en placas con medio LB y el antibiótico correspondiente, ampicilina para el plásmido pUC19 o zeocina para el plásmido pPICZ α ; la selección de las posibles cepas en las placas se realiza utilizando el asa de Disbralsky.

4.2.8.2.- Transformación de *P. pastoris* (Higgins and Cregg, 1998).

Preparación de células competentes de *P. pastoris*

1. Se inocula 10 mL de medio YPD con una alícuota fresca de *P. pastoris* y se cultiva toda la noche.
2. El cultivo de toda la noche se utiliza para inocular 500 mL YPD en un matraz de 2 L, partiendo de una DO₆₀₀ = 0,1 hasta llegar a una DO = 1,3-1,7.
3. Centrifugar el cultivo a 2000 \times g y a 4 °C y resuspender las células en 100 mL de YPD + 20 mL de Hepes (1 M, pH 8,0)
4. Adicionar 2,5 mL de DTT 1M y agitar suavemente, durante 15 min a 30 °C.
5. Llevar a 500 mL con H₂O destilada estéril. Centrifugar a 2000 \times g y 4 °C y lavar con 250 mL de H₂O destilada estéril, luego en 20 mL de sorbitol 1 M y resuspender en 0,5 mL de sorbitol. Se realizan alícuotas de 40 μ L que se almacenan a -80 °C, para su posterior transformación por electroporación.

Transformación

6. Para realizar el proceso de transformación mediante electroporación se adiciona 0,1 μ g de la muestra de DNA en 5 μ L de H₂O_{miliQ} ó tampón Tris·HCl 10 mM EDTA 1 mM (pH 7,5), en tubo conteniendo 40 μ L de células competentes, luego transferir a una cubeta de electroporación previamente enfriada en hielo, se aplica un pulso de corriente según recomendaciones del fabricante del electroporador para las levaduras (Tabla 4.7).
7. Inmediatamente se ha de adicionar 1 mL de sorbitol 1M y transferir el contenido de la cubeta a un tubo estéril de 1,5 mL.
8. Se han de sembrar a la brevedad las células en placas petri conteniendo medio YPD con zeocina; se dejan incubar por 4 días y se analizan los transformantes que se

desarrollen en las placas, realizando cuatro resiembras sucesivas para confirmar la pureza del cultivo y la integración del plásmido. Posteriormente, se realizó cultivos en Erlenmeyer en medio BMM de los clones aislados para analizar los niveles de actividad lipasa en relación a biomasa, para determinar así el clon más óptimos para los cultivos en fermentadores.

Las cepas generadas en cada etapa de experimentación se conservaron en crioviales con 20% de glicerol y a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y su observación microscópica se realizaron con un microscopio Zeiss equipado con un sistema de video y un software para capturar imágenes.

Tanto para la transformación de *E. coli* como de *P. pastoris* se utilizó un electroporador Gene pulser, Biorad (Fig. 4.7), con cubetas de 2 mm.

Tabla 4.7.- Parámetros para electroporación para *E. coli* y *P. pastoris*

Microorganismo	Volumen de muestra (μL)	Voltaje de carga (V)	Capacitancia (μF)	Resistencia (Ω)	F. de campo (KV/cm)
<i>E. coli</i>	50	2500	25	200	12.5
<i>P. pastoris</i>	40	1500	25	200	7500



Fig. 4.7.- Electroporador, equipo utilizado para la integración de material genético tanto para *E. coli* como para *P. pastoris*.

4.3.- Cultivos de *Pichia pastoris*.

4.3.1.-Cultivos en matraces Erlenmeyer para selección de cepas productoras de rLip2.

Se realizaron cultivos de *P. pastoris* a pequeña escala, en matraces Erlenmeyer, para la selección de cepas productoras de la proteína de nuestro interés (rLip2) y para iniciar las fermentaciones en biorreactores. En ambos casos se procedió de la siguiente manera: Para la selección clonal, se sembraron las cepas de *P. pastoris* desarrolladas posterior a la transformación en placas YPD zeocina al 2% de agar, proceso llevado a cabo en una cámara de flujo laminar Telstar BH-10 (Telstar, Terrassa, España), con 20 µl del stock, por placa petri, almacenado a -80 °C en una solución rica en glicerol, tal como recomienda el manual de Invitrogen (*Pichia fermentation manual*). Las placas se dejaron incubar durante 72 h en una estufa a 30 °C. A partir de las colonias desarrolladas se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio YPD zeocina incubando los matraces a 30 °C de temperatura y 250 rpm de agitación durante 24 h en un incubador orbital Memmert BKE 40 (Mettler, Schwabach, Alemania), posterior a lo cual se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min para separar el medio de las células, en una centrifuga Heraeus Sepatech Megafuge 1.0 (Sepatech, Hanau, Alemania); éstas células se resuspendieron en 100 mL de medio BMM, es decir, en presencia de substrato inductor de la expresión de *rlip2*, para cuantificar actividad lipásica extracelular específica de cada cepa y así discernir en base a la actividad lipásica específica la mejor cepa productora. En el caso que el cultivo-inóculo en YPD fuera dirigido a una inoculación de un biorreactor, se inocularon matraces Erlenmeyer de 1000 mL con 250 mL de medio YPD zeocina, incubando los matraces a 30° C de temperatura y 250 rpm de agitación durante 24 h, posterior a lo cual se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min para separar el medio de las células, las cuales se resuspendieron en 100 mL de PBS pH 7.0 para inocular el correspondiente biorreactor. En todos los experimentos con *P. pastoris* se utilizaron Erlenmeyers con deflectores para mejorar la aireación del cultivo (Villatte, F. *et al.*, 2001).

4.3.2.- Cultivos de *P. pastoris* en fermentadores.

4.3.2.1.- Biorreactor discontinuo (*batch*): Para los cultivos en discontinuo se utilizó un fermentador Braun Biotech International modelo Biostat B (Fig. 4.8) con una cuba de dos litros de volumen operativo, utilizándose un volumen inicial de fermentación de 1,5

litros. Este sistema de cultivo se utilizó para realizar una primera serie de cultivos en medio BMM a distintos pHs 5,5; 6,5 y 7,5 ajustado inicialmente con un tampón fosfato de potasio y controlado durante el cultivo mediante HCl 0,5 M y NaOH 0,5 M. Los cultivos se realizaron a una temperatura de 30 °C, con una consigna de aireación de 1,5 L/min y una agitación de 800 rpm.

Para la caracterización preliminar de rLip2 se realizó una fermentación en *batch* en un fermentador Braun Biotech International modelo Biostat B con una cuba de cinco litros de volumen operativo, utilizándose un volumen inicial de fermentación de 3,5 litros, bajo las mismas condiciones que para los ensayos de pH.

El reactor se esterilizó por calor mediante autoclave con el tampón fosfato en su interior agregando posteriormente el resto de los componentes del medio BMM esterilizados mediante filtración con filtro millipore 0.22 μm de diámetro de poro (Sterivex-Gp 0.22 μm polyethersulfone with Bell out Radio Sterilized). El inóculo se obtuvo a partir de un cultivo en matraz Erlenmeyer de 1 litro con 200 ml de medio YPD incubado por 24 horas a 30 °C y 250 rpm de agitación. El cultivo inóculo se centrifugó a 8000 rpm durante 20 min, resuspendiendo las células en 100 ml de agua destilada estéril para su inoculación en el reactor.

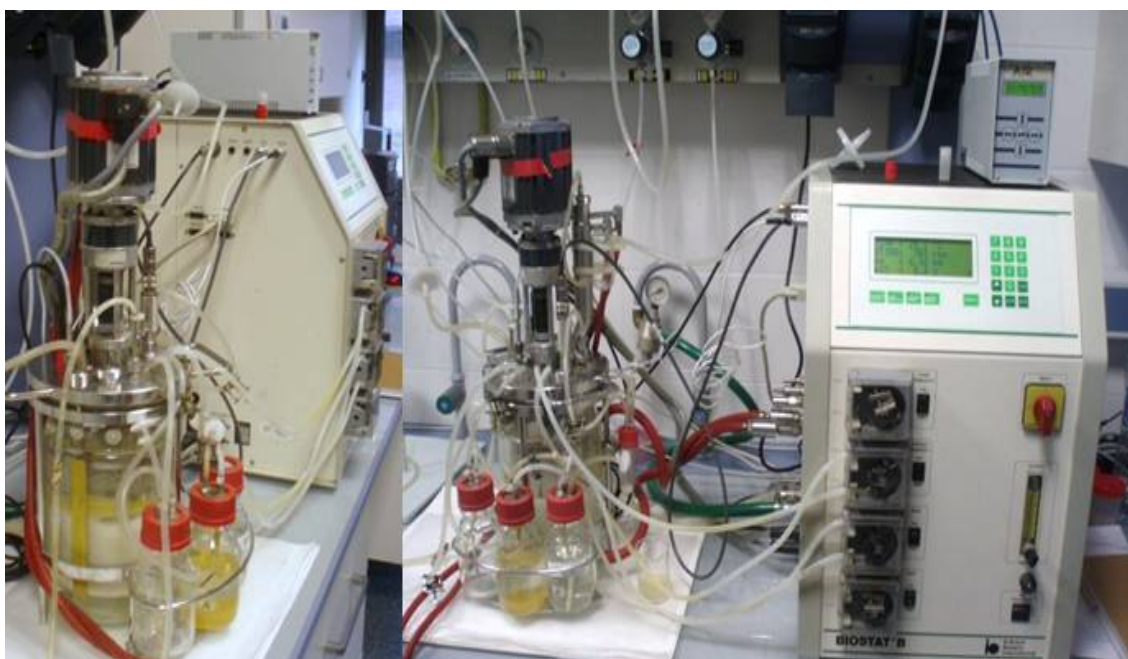


Fig. 4.8.- fermentador Braun Biotech International modelo Biostat B, para los cultivos en discontinuo.

4.3.2.2.- Biorreactor discontinuo alimentado (*fedbatch*): Para nuestro estudio la realización de las fermentaciones en el sistema discontinuo alimentado, se utilizó un fermentador B. Braun modelo Biostat ED. El fermentador se compone de una cuba de 5 litros y de una unidad de control DCU conectada a un ordenador (Fig. 4.9) donde se encuentra operativo un software desarrollado en el grupo de investigación registro propiedad intelectual 021200412951. Este software permite controlar los parámetros de la fermentación, el rango de pH al cual se desea trabajar, el caudal de aire y la agitación entre otros. También se puede controlar el equipo de adición de los caudales de alimentación formado por dos microburetas de 100 y 500 μL . Igualmente se dispone de la medida en línea del CO_2 producido y del O_2 consumido mediante un equipo de detección de gases (Multor 610, Hamburgo, Alemania) conectado al fermentador y que permita registrar las señales correspondientes en un ordenador. En paralelo, monitoriza y controla la señal de metanol proveniente de un analizador en línea de metanol (MC-168, PTI Instruments Inc., Kathleen, USA), que utiliza un sensor de metanol TGS 822 (TGS 822, Figaro, Osaka, Japón). El control de la adición de metanol esta dado por un controlador proporcional Integral (controlador PI) que permite una respuesta rápida y de bajas oscilaciones para así mantener una concentración lo mas cercana a la consigna dada para la fermentación en el periodo de inducción. Con este sistema de monitorización y control se puede seguir eficientemente el desarrollo de la fermentación en línea.



Fig. 4.9. Reactor discontinuo en cultivo de *P. pastoris*. Se aprecia en la figura las microburetas de alimentación y la unidad de control de parámetros DCU, además del ordenador de control de fermentación.

4.3.2.3.- Protocolos de fermentación (Cos., 2005).

A continuación se presentan los pasos que se han de realizar de forma cronológica para proceder a las fermentaciones en discontinuo y discontinuo alimentado.

4.3.2.3.1.- Pre-inóculo.

Las cepas utilizadas en este trabajo experimental son conservadas en pequeñas cantidades (recipientes de 1 ó 2 mL) a -80°C en un medio rico en glicerol, tal como recomienda el manual de Invitrogen (*Pichia* fermentación manual). De estos recipientes se cogen 10 ó 20 µL, que se extienden sobre una placa de petri YPD-Zeocina en condiciones estériles. La placa se ha de mantener durante 48 horas dentro de una estufa a 30°C, tapada con parafilm o con papel aluminio para evitar que la circulación de aire dentro de la estufa seque el agar.

A continuación, se disuelven 0,5 g de extracto de levadura y 1 g de peptona en 40 mL de agua destilada en dos Erlenmeyers de 250 mL. Se tapan los dos Erlenmeyers con tapas de algodón y papel, y se autoclavan a 121°C durante 30 min.

Una vez fríos se cogen, bajo condiciones estériles (Cámara de flujo), 5 ml de glicerol 10X y 5 mL de fosfato de potasio 1 M pH 6,0; los dos previamente esterilizados a temperatura ambiente. Mediante una jeringa de 1 ml con un filtro de líquido estéril de 0,45 µm (Milipore, Bedford, USA), se introducen al medio unas 4 ó 5 gotas de la solución de Biotina 500X.

Finalmente, se inoculan los matraces con un par de asas llenas de levaduras cogidas desde la placa petri. Una vez inoculados se introducen en el incubador orbital a 30°C y 250 rpm durante 24 h.

4.3.2.3.2.- Inoculo.

Dentro del recipiente del fermentador B. Braun Biolab se disuelven en 300 mL de agua destilada, 5 g de extracto de levadura y 10 g de peptona. El reactor se autoclave con el medio en su interior, dejando una entrada semi-abierta para evitar sobrepresión. Conjuntamente con el reactor también se autoclave en embudo que se pueda introducir en alguna de las entradas del reactor, una probeta de 100 ml y dos potes de centrífuga de 250 mL (todo este material ha de ser envuelto en papel de aluminio para conservar posteriormente su esterilidad).

Se introducen al fermentador en condiciones estériles, 100 mL de Glicerol 10 X, 50 mL de fosfato de potasio, ambos utilizando la probeta estéril, y 1 mL de Biotina 500X con jeringa y filtro de baja adsorción proteica.

Transcurrido el tiempo de cultivo de los Erlenmeyers, se sacan del orbital y se mira su absorbancia al espectrofotómetro a 600 nm para conocer cual es la concentración de biomasa aproximada. Haciendo una dilución 1:20, la absorbancia ha de estar sobre 0.7 – 0.8 para conseguir que todo el proceso de fermentación sea reproducible. En el caso que sea inferior o superior, se ha de poner el volumen necesario de agua destilada estéril para conseguir una concentración de microorganismos igual a la absorbancia recomendada en 50 mL.

Una vez ya se han introducido al interior del reactor la totalidad de los compuestos del medio y la biomasa, se tapan todas las salidas, asegurándose de esta forma de mantener la esterilidad al interior del recipiente. Se conectan la entrada y la salida, ambas protegidas por filtros de aire de 0.2 μm (MiliporeFG, Bedford, USA) regulando el caudal que pasa del difusor entre 2 y 3 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. La temperatura de trabajo fue de 30° C y se mantiene un sistema de una manta térmica y un dedo frío, que calientan o enfrían en el interior del biorreactor, respectivamente.

Por último, se pone en marcha el condensador y el agitador a 800 rpm. El tiempo de cultivo es de 24 h.

4.3.2.3.3.- Puesta en marcha del cultivo.

El protocolo a de seguir para realizar tanto el cultivo discontinuo como el discontinuo alimentado (“fed-batch”) son idénticos en su fase inicial de arrancada. Lo único que les diferencia es la utilización de diferente composición del medio inicial, con las pequeñas modificaciones del protocolo que eso puede comportar.

Antes de proceder a la esterilización del reactor es necesario que los siguientes complementos del fermentador sean esterilizados por separado en autoclave:

- Inyector de 3 vías (para la adicción de base, el inóculo y el antiespumante) (al menos dos de las vías han de estar preparadas para el funcionamiento con las bombas peristálticas del Biostat ED). Todos los tubos han de estar cerrados con llaves Hoffman y envueltos con papel de aluminio. En el extremo de los tubos es necesario montar las agujas metálicas.
- Inyector de 1 vía (para la adicción de glicerol). El tubo cerrado con Hoffman y envuelto con papel de aluminio.

- Los inyectores se tapan con las correspondientes capuchas metálicas para mantener su esterilidad fuera del autoclave.
- 1 botella con *septum* de 1 L con agua destilada para ajustar el volumen a 3,5 L después de inocular.
- 1 botella con *septum* de 500 mL con 300 mL de agua destilada (para el inculo).
- 1 botella con *septum* de antiespumante.
- 1 botella con *septum* de 500 mL con HCl 1 M (para la esterilización química de la microbureta).
- 1 botella con *septum* de 500 mL con NaOH 1 M (para la esterilización química de la microbureta).
- 1 botella con *septum* de 500 mL con agua destilada (para la esterilización química de la microbureta).
- 1 botella con *septum* de 500 mL vacía (para recoger el líquido sobrante de la esterilización química de la microbureta).
- 2 potes de 250 mL de la centrifuga Beckman J2-21 M/E. Es necesario esterilizarlos ligeramente abiertos y tapados con papel de aluminio.
- La “T” de la salida de gases, todas las salidas necesitan que esten envueltas con papel de aluminio.
- 1 botella con *septum* de 250 mL de glicerol 50% v/v.

Es necesario poner todo en una cesta metálica y esterilizarlo a 121° C durante 30 min.

Aparte, pero sin pasar por el autoclave se preparan las siguiente botellas.

- 1 botella con *septum* de 500 mL con etanol al 70%.
- 1 botella con *septum* de 1 L de metanol puro.

Según la solución a utilizar en función del medio de cultivo, es necesario esterilizar o no la botella. Por ejemplo, en el caso de la solución de amonio al 30% no se puede autoclavar y se puede utilizar directamente en la fermentación.

A continuación se procede al montaje del reactor con independencia del medio de cultivo a utilizar. Es importante que en el proceso de preparación de cualquier medio de cultivo a utilizar, el glicerol sea el último componente a adicionar, ya que se ha comprobado que esto mejora la solubilidad de las sales inorgánicas.

Preparación del reactor

- Limpieza: es necesario limpiar con agua destilada el interior del reactor e intentar sacar todos los precipitados que puedan haber quedado adheridos a las paredes de

las palas y del serpentín. No se debe utilizar ni jabón, ni lejía, y en el caso que se utilice se ha de grandes cantidades de agua destilada para evitar que queden restos de estos componentes.

➤ Instalación de las sondas:

- ▲ Sonda de pH: antes de colocar la sonda dentro del reactor es necesario calibrarla con tampón pH 7,0 y pH 4,0 (Panreac, Castellar del Vallès, España). Para este fin, se utiliza el menú del control digital de la DCU (calibration → pH).
- ▲ Sonda pO₂ (oxígeno disuelto): el calibrage de esta sonda se realiza después de la esterilización. Lo que se ha de hacer antes de la esterilización es el cambio de electrolito y sustituir la membrana en el caso que se vea deformada. Se ha de comprobar que al conectar la sonda la medida va bajando progresivamente hasta llegar a un valor aproximado del 70-80%. Si no es así, se ha de substituir el electrolito y la membrana.

Montaje del fermentador:

Para realizar el montaje y la preparación del fermentador es necesario:

- ▲ Asegurarse que el cierre de la tapa del reactor está en buen estado y sellado con silicona.
- ▲ Adicionar el medio inicial y enrasar a 3,5 L con agua destilada.
- ▲ Colocar la tapa y atornillar las roscas de forma firme.
- ▲ Colocar el manómetro, la válvula de seguridad, la entrada de aire con el filtro y el condensador más el portafiltros con el filtro en su interior.
- ▲ Asegurarse que el aire entra por la entrada superior del reactor y no se introduce por el difusor situado en la parte inferior.
- ▲ Asegurarse que no circule agua por el condensador, (El grifo tiene que estar bien cerrado).
- ▲ En el resto de entradas del fermentador colocar un *septum* con su correspondiente tapa.
- ▲ Desconectar la salida de gases del fermentador que se dirige al equipo de presión y al analizador.

Esterilización

- ▲ Antes de esterilizar se coloca la camisa metálica protectora alrededor del cilindro de vidrio del reactor, como medida de seguridad.

- ▲ Es necesario asegurarse que todas las entradas/salidas del reactor están bien cerradas.
- ▲ Se ha de comenzar el programa automático de esterilización de la DCU (Batch Process F1 (Esterilización) Start). El proceso mantendrá el reactor durante 30 minutos a 121°C.

Conexión del equipo de gases (Multor 610, Hamburgo, Alemania): Conectar el equipo de gases, para que se caliente progresivamente y esté operativo cuando se comience la fermentación.

- ▲ **IMPORTANTE:** El tubo de los gases de salida del fermentador ha de estar desconectado del control de presión y del equipo de análisis de gases durante el proceso de esterilización.
- ▲ Finalmente se deja enfriar el reactor durante unas dos horas hasta que esté a temperatura ambiente.

4.3.2.3.4.- Puesta en marcha del cultivo discontinuo.

Para realizar la inoculación y como pasos previos es necesario:

- ▲ Instalar el inyector de 3 vías en una de las entradas superiores del fermentador. En las máximas condiciones de esterilidad, se ha de colocar el inyector, atravesando el *septum* y enroscando con fuerza para evitar fugas. Por uno de los canales pasará la solución de amonio al 30% (utilizado como base para controlar el pH a 6,5) y la otra vía, servirá para la inoculación, después para agregar el agua y enrasar a 3,5 L y finalmente para la adicción puntual de antiespumante.
- ▲ Ajustar el pH del medio. Algunos de los medios utilizados tienen un pH inicial muy diferente a 6,5. Para ajustar el pH se irá agregando la base del medio seleccionado (por uno de los canales del inyector de 3 vías) hasta llegar aproximadamente a un pH de 6,3 (no llegar a pH 6,5; ya que todavía hay que agregar el inóculo, agua y las “Trace salts” que pueden cambiar el pH).
- ▲ Agregar por la salida de extracción de muestras 15,5 ml de “Trace sals” con una jeringa de 20 ml y filtro estéril de 0,45 μm (Milipore).
- ▲ El calibrado de la sonda de pO_2 debe hacerse justo antes de inocular, y con el reactor y la sonda de pO_2 a temperatura ambiente (si todavía están calientes de

esterilización, el calibrado no será correcto). Para realizar el calibrado es necesario seguir antes de todo los siguientes pasos:

- Poner la agitación a la velocidad de 800 rpm. (Este valor se mantendrá constante durante todo el cultivo).
- Conectar la salida de gases del fermentador al equipo de presión, para que se realice la fermentación a una presión conocida. Con el objetivo de que el gas llegue al equipo de análisis, se ha de conectar el módulo de control del caudalímetro/controlador másico, en un valor de consigna de aproximadamente $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Conectar el aparato de entrada de aire al reactor para conseguir que el aire entre por el difusor.
- Conectar el control de caudal de aire a $4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Se espera unos 5 minutos (hasta que la lectura sea constante, se supone estado estacionario). Se fija este valor a 100% de saturación. (DCU, Calibración—pO₂—100%).
- Para conseguir el cero, es necesario cerrar la entrada de aire al fermentador y sustituirla por la entrada de nitrógeno puro. Mantener conectado hasta llegar al estado estacionario. Comprobar que entren $4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ y que el control de presión se mantiene a una consigna del 10% (1,1 atm.).

Inoculación:

- ▲ Centrifugación del inóculo (BIOLAB): Una vez transcurridas las 24 horas de cultivo en el BIOLAB, es necesario centrifugarlo para cambiar de medio complejo a medio sintético. Se trasvasa todo el medio a los 2 potes de la Centrífuga KONTRON de 250 ml previamente esterilizados y del mismo peso.
- ▲ Los potes, una vez bien tapados se llevan a la Centrífuga (Centrikon H-401 ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suiza), donde a 4° C y 8000 rpm por 10 min, se separa la biomasa del resto del medio.
- ▲ Volviendo otra vez a la cámara de flujo, se elimina el líquido del centrifugado y se resuspende la biomasa con el agua estéril de la botella estéril de 300 mL. Una vez que toda la biomasa está en suspensión, se vuelve el líquido a la botella con *septum* destinado al inóculo.

- ▲ Se introduce el líquido contenido en esta botella, mediante uno de los canales del inyector de 3 vías con la bomba del equipo B. BRAUN. Seguidamente se conecta este canal con la botella de agua estéril para arrastrar la biomasa adherida a las paredes del canal. Se continúa introduciendo agua hasta llegar a un volumen de 3,5 L (Para medir el volumen inicial, es necesario parar la agitación y la adicción de aire).
- ▲ Se vuelve a conectar el caudal de aire y la agitación a las consignas de trabajo (1,5 L·min⁻¹ y 800 rpm, respectivamente).
- ▲ Se adiciona manualmente con la bomba peristáltica del fermentador la cantidad necesaria de solución de amonio al 30% para conseguir el pH deseado de trabajo de 6,5.
- ▲ Se conectan los programas del ordenador que se encargan de la monitorización y control de todas las variables, y se esperan breves instantes hasta que todas las variables se mantengan constantes (sobretudo el pO₂ que ha disminuido cuando se ha parado momentáneamente la agitación).
- ▲ Se extrae la primera muestra, y se comunica al ordenador que en este preciso instante se comienza la fermentación (PC2 –INICIO—Comienza Fermentación).

4.3.2.3.5.- Puesta en marcha del cultivo discontinuo alimentado.

Pasos previos antes de comenzar el cultivo semicontinuo:

- ▲ Esterilización química de las microburetas automáticas: Se conecta en el mismo pote de agua estéril destinado a este fin y a través del *septum*, los otros canales de entrada a las microburetas. Los tubos de salida de las microburetas, se conectan a la botella vacía esterilizada previamente.
- ▲ Para que las microburetas se laven automáticamente es necesario activar la adicción continua desde el programa del ordenador.
- ▲ La secuencia de soluciones a pasar por las microburetas es agua, ácido, agua, base, agua, etanol, agua y finalmente dos ciclos de lavados con la solución que se va adicionar con la microbureta (metanol, glicerol, o cloruro de amonio).
- ▲ A continuación, trabajando bajo condiciones estériles (etanol 70%), se conectan al reactor los inyectores para cada uno de los canales provenientes de las microburetas de las entradas correspondientes (es necesario recordar que si se miden en línea la concentración de metanol con el equipo MC-168, el inyector de adicción de este substrato es necesario introducirlo por la parte inferior del reactor).

- ▲ Se ha de conectar el tubo de salida de las microburetas automáticas con el tubo de silicona del correspondiente inyector, y llenar, mediante adiciones manuales cada uno de los líquidos hasta que este a punto de caer la primera gota al interior del reactor.
- ▲ En el momento que se decide comenzar el cultivo semicontinuo, solo es necesario picar en el apartado de Transición del programa del ordenador, el botón START y las microburetas comenzaran a adicionar el volumen deseado por el usuario o que decida el algoritmo de control.

Puesta en marcha del equipo de análisis de metanol.

El equipo MC-168 permite la medida en línea del metanol existente en el corriente gaseoso. Si se conoce esta concentración se puede establecer una relación directa con el metanol en fase líquida existente dentro del reactor. Para asegurarse sea correcta, es necesario que el funcionamiento del reactor sea lo más estable posible. Por tanto, variaciones bruscas del caudal de aire, agitación o presión, provocan que se falsee la medida.

A continuación se detallan los principales aspectos que son necesarios tener en cuenta antes de conectar el equipo al fermentador:

- ▲ Los parámetros de la curva de calibración realizada anteriormente a la fermentación, han de estar incluidos en el programa del ordenador, dando directamente la cantidad que supuestamente hay de metanol en la fase líquida y por lo tanto accesible para el microorganismo.
- ▲ Para que la medida de metanol tenga el menor tiempo muerto posible, se ha de colocar una “T” estéril, después del portafiltros de salida del reactor. Esta nueva salida de gas del fermentador se dirige directamente al equipo de medida, el MC-168.
- ▲ Una vez conectado, se ha de asegurar que la línea que se dirige asía el equipo contiene, en este orden, una trampa de líquido, un prefiltro suelto de algodón y un filtro de gases de 0,20 μm (Millipore FG, Bedford, USA). A continuación, y justo antes que el canal de gas entre en el equipo de medida, este canal pasa por un caudalímetro/controlador másico que asegura el paso constante, minimizando las fluctuaciones, de 0,3 L/min de gas proveniente del fermentador.
- ▲ Una vez finalizado el montaje de la línea, se puede conectar el equipo, y en 2 ó 3 minutos ya se tendrá una medida en línea de metanol.

Fases de la fermentación en discontinuo alimentado

Previo a explicar las tres fases indicar que la temperatura de operación es 30°C, se trabaja a 80 rpm y con un caudal de aire máximo de 20 L/min (4 vvm), estando el pH controlado al valor óptimo de 6.5.

Los cultivos en discontinuo alimentado presentan tres fases:

La primera fase es la fase de obtención de biomasa, comienza con la inoculación de la fermentación en donde se aprecia un decrecimiento constante del oxígeno disuelto. Al término de esta fase se observa una súbita subida de oxígeno disuelto, lo que indica que el microorganismo ha consumido en su totalidad el glicerol y por ende ha detenido su metabolismo de crecimiento, en la fermentación de *Pichia* esta fase presenta una duración aproximada de 24 horas.

La segunda fase es la fase de transición, en esta fase se procede al cambio gradual de la fuente de carbono utilizada por el microorganismo. Desde la adicionada inicialmente para la obtención de biomasa, glicerol a la de inducción en nuestro caso metanol para así activar el promotor AOX1 y con ello la producción de nuestra proteína recombinante. Esta fase presenta una duración de 5 horas y utiliza los siguientes caudales de glicerol y metanol. Durante las dos primeras horas solo se alimenta glicerol con un caudal constante de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ para irse reduciendo en las tres siguientes horas a 160, 100 y finalmente 65 $\mu\text{L}/\text{min}$ en la última hora. Durante esta fase el metanol siempre se encuentra como substrato limitante. Simultáneamente a partir de la tercera hora se adiciona un caudal constante de metanol de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$

La tercera fase es la fase de inducción, en esta fase es alimentado el cultivo de forma exclusiva con metanol, substrato inductor de la expresión de rLip2 se mantiene un control de la concentración de metanol fijándose una consigna de 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. El periodo de duración de esta fase es variable y se ha de seleccionar un criterio para finalizar las fermentaciones.

Las fermentaciones fueron detenidas utilizando como criterio la medida de oxígeno en el interior del biorreactor, es decir, cuando los niveles de pO_2 bajaban de la consigna del 20% previamente definida, trabajando el equipo con un caudal de entrada de aire de 20 L/min y 800 rpm límite del mismo e insuficiente para mantener la consigna de pO_2 , en este instante se procedía a detener la operación en el biorreactor.

4.4.- Análisis de las distintas variables en los procesos de fermentación.

4.4.1.- Biomasa.

La biomasa se puede determinar tanto mediante densidad óptica como por peso seco.

4.4.1.1.-Biomasa mediante densidad óptica: para *P. pastoris* se determina midiendo la densidad óptica a 600 nm, en un espectrofotómetro, en el rango de absorbancia entre 0,1 y 1, si es mayor se diluye, el aumento de la densidad óptica refleja un aumento de la biomasa.

4.4.1.2.-Biomasa mediante peso seco: se pesa y rotula el filtro de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore) que se va a utilizar, con el cual se filtra un volumen conocido de la suspensión de células a analizar, el filtro se pone a secar en una estufa a 100° C hasta que se obtiene un peso constante, a este valor se le resta el valor inicial del peso del filtro y se divide por el volumen de la muestra, expresando la biomasa en g/L, se ha de lavar la muestra con agua destilada en el doble de su volumen para eliminar el máximo posible las sales.

4.4.2.- Análisis de metanol.

El método que se describe a continuación permite el análisis del alcohol metílico utilizado como fuente de carbono para el cultivo de la levadura *P. pastoris*, este método fue utilizado en paralelo a la determinación de metanol en línea, para así llevar un control exhaustivo del metanol al interior del biorreactor. El rango de análisis de este analito está comprendido entre los 10 y 0,1 gramos por litro. La cuantificación se realiza mediante patrón interno (2-Propanol) 4 g/L.

Instrumentación:

Para el análisis se utilizó el Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 (Hewlett Packard, Palo Alto, California) equipado con columna capilar e inyector automático Hewlett Packard 7376A, y detector de ionización de llama (FID). Los datos se almacenaron y cuantificación con el software Millennium 32.

Condiciones cromatográficas:

- Columna: TR-FFAP 25m x 0.53 mm x 1.00 µm de película, Tracer-Teknokroma, St Cugat del Vallès, Barcelona, España.

- Portador: Helio, 9,0 mL/min.
- Inyección: 1 µL, Split 1:5,5.
- Tiempo de análisis: 15 minutos.
- Temperatura inyector: 200 °C.
- Temperatura detector: 280 °C.
- Temperatura horno: 2 min a 40 °C, hasta 200 °C rampa a 20 °C/min, 5 min a 200 °C.

Preparación de las muestras:

Las muestras a analizar previamente se centrifugaron y filtraron por una membrana de 0.45 µm. Las muestras deben quedar totalmente transparentes y sin partículas en suspensión. La inyección se realiza directa sin diluciones.

4.4.3.- Análisis de glicerol:

El método que se describe a continuación permite el análisis de azúcares y ácidos orgánicos, usados como fuente de carbono para el cultivo de microorganismos, así como los productos de su metabolismo, ácidos orgánicos y alcoholes; nosotros lo utilizamos para el análisis de glicerol.

Instrumentación:

Para el análisis se utilizó el Cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard 1050 (Hewlett Packard, Palo Alto, California) con bomba isocrática e inyector automático. Como detector se utilizó un detector de índice de refracción Hewlett Packard 1047A. Los datos se almacenaron y cuantificaron con el software Millennium 32.

Condiciones cromatográficas:

- Columna: Aminex HPX-87H de Bio Rad.
- Fase móvil: Agua Milli-Q a pH 3.00.
- Caudal: isocrático de 0.6 mL por minuto.
- Volumen de inyección: 20 µL.
- Tiempo de análisis: 30 minutos.
- Temperatura: 25 °C (ambiente).

Preparación de la fase móvil:

Como fase móvil se utiliza H₂SO₄. Esta se prepara con agua tipo Milli-Q (resistencia 18.2 Ω) y ajustando su pH a 3.00 con el ácido. Se filtra el eluyente a través de una membrana de 0.45 μm de diámetro de poro, con ayuda de vacío y se deja desgasificar durante 10 minutos hasta que no se aprecie burbujeo.

Preparación de los patrones:

Se preparan a partir de una disolución concentrada (normalmente 20 o 50 g/L) del compuesto, en eluyente y se filtra con una membrana de 0,45 μm. Las diferentes concentraciones del patrón se hacen a partir de diluciones.

Preparación de las muestras:

Las muestras a analizar deben estar previamente bien centrifugadas y filtradas por una membrana de 0,45 μm de diámetro de poro (tipo Millipore HAWP01300). Estas deben quedar totalmente transparentes y sin partículas en suspensión. Para los análisis se mezclan volúmenes iguales de la muestra y del patrón interno, la inyección se realiza directa sin diluciones.

4.5.- Análisis cuantitativo y cualitativo de proteínas.

4.5.1.- Análisis cuantitativo de proteínas.

4.5.1.1- Análisis de proteína extracelular e intracelular

La cuantificación de proteína total en las muestras del cultivo previamente centrifugado y analizado el sobrenadante para proteína extracelular, o en lisados celulares clarificados mediante centrifugación para análisis de proteína intracelular, los lisados se realizaron mediante un disruptor celular Constant Cell Disrupton Systems, modelo One Shot.

Método de Bradford

El análisis de proteína total se realizó mediante el método de Bradford (Pierce 1989). Este método presenta una gran utilidad, por su rapidez y reproducibilidad. Además, al presentar una baja interferencia permite ser recomendado para medios con una elevada concentración salina.

Existen dos rangos de concentración que determinan el procedimiento a seguir en cada caso:

Procedimiento estándar en el rango de 100 a 1500 µg/mL.

1. Se prepara y luego se dispone en una microplaca una serie patrones de concentraciones de proteína, diluyendo una solución estándar de albúmina de suero bovino en siete puntos de calibración entre 75 y 1500 µg/mL, además del blanco (agua destilada). A cada punto de calibración y al blanco se le adiciona 250 µL de la solución de la solución patrón de azul de Coomassie, previamente agitado por inversión a temperatura ambiente.
2. Se disponen del blanco y los patrones de proteína en una zona determinada de la microplaca, adicionando 5 µL de cada patrón más 250 µL de la solución patrón de azul de Coomassie.
3. Se procede a poner en la microplaca 5 µL de muestra a analizar más 250 µL de la solución patrón de azul de Coomassie.
4. Se procede a leer a una absorbancia de 595 nm.
5. La absorbancia de cada muestra es procesada (restándose el valor del blanco) e integrada dentro de la curva de calibración y posteriormente valorada para dar un valor de concentración total de proteínas.

Procedimiento estándar en el rango de 1 a 25 µg/mL.

Se procede de igual forma a la indicada para el rango entre 100 y 1500 µg/mL, pero generando un rango de calibración entre 1 y 25 µg/mL, pero en este caso se ha de mezclar 150 µL de la muestra con 150 µL de la solución patrón de azul de Coomassie.

4.5.2.- Análisis cualitativo de proteínas.**4.5.2.1.-Geles de Poliacrilamida SDS-PAGE**

Se realizó siguiendo el método de Sambrock *et al.*, 1989 en geles de poliacrilamida. En la tabla 4.6 se detalla la proporción del gel separador (acrilamida 12 y al 7,5% (p/v) y apilador (acrilamida 4%, p/v). Previamente a la electroforesis, las muestras se diluyeron en tampón Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 10% (p/v) y 2 mercaptoetanol 10% (v/v), con lo que se procedió a su desnaturalización química y térmica calentando la muestra a 50 °C por 1 hora o a 100 °C por 5 min, en seguida las muestras se cargaron en los posillos del gel apilador preparados para tal motivo, la electroforesis se realizó en un equipo vertical minigel (Bio-Rad) siendo corridos con

una intensidad de 20mA por gel durante 100 min. El tampón de corrida de electroforesis contenía Tris·HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v). Generalmente, los geles se corrieron de a dos uno de ellos se teñía mediante tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie para geles de poliacrilamida, según correspondía a la concentración de proteínas que estimábamos detectar en los geles, el segundo gel era transferido a una membrana de nitrocelulosa para realizar un western-blot o a una membrana de Nylon para realizar análisis de secuencia amino acídica del extremo N-terminal de la proteína de interés.

Tabla 4.8. Contenido geles SDS PAGE

Compuesto	Acrilamida al 12%	Acrilamida al 7,5%	Acrilamida al 4%
Agua mQ	3.35 mL	4.85 mL	6.1 mL
Tris·HCl 1.5M, pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	
Tris·HCl 0.5M, pH 6.8			2.5 mL
SDS 10% (w/v)	100 µL	100 µL	100 µL
Acrilamida30%/Bis2.7%	4.0 mL	2.5 mL	1.33 mL
Persulfato de amonio	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	10 µL
Volumen Total	10 mL	10 mL	10 mL

4.5.2.2.- Tinción de geles SDS-PAGE.

✓ Tinción con azul de Coomassie: Esta tinción se realizó con azul de Coomassie R-250 en condiciones ácidas para favorecer las interacciones electrostáticas entre las moléculas del azul de Coomassie y los grupos aminos de la proteínas, presentando esta técnica un límite de detección del orden de los 30 ng de proteína.

Después de realizar la electroforesis los geles se mantuvieron durante una hora en una solución colorante, formada por azul de Coomassie R-250 0,1% (p/v), ácido acético 10% (v/v) y metanol 40% (v/v), a continuación se procedieron a desteñir mediante una solución compuesta por ácido acético 10% (v/v) y metanol 40%(v/v).

Dado que en las distintas fermentaciones no se pudo apreciar la presencia del monómero de rLip2, hasta el final del proceso de ultrafiltración y estimando que este hecho era debido a un factor combinado de elevada concentración de proteína y alta hidrofobicidad del medio de cultivo, dada su alta carga salina. Las muestras de la

fermentación 3 fueron previamente desalinizadas mediante el paso de 2 mL de muestra extraída del bioreactor y recuperadas pasándolas por las columnas de desalinización (HiTrap™ Desalting Column, GEHealthcare ref. 17-6002-33), previamente equilibradas con tampón Tris·HCl 200 mM pH 7,0.

Los geles teñidos tanto con azul de Coomassie se procedieron a prehidratar sumergiéndolos 30 min en agua destilada y luego se secaron por 2 h en papel celofán, para posteriormente ser escaneados para el análisis densitométrico, mediante el software Quantity One v 4.6.2 de Laboratorios Bio-Rad.

4.5.2.2. Desglicosilación enzimática.

Se intentó la determinación del grado de glicosilación de rlip2, procediendo a la desglicosilación enzimática, para así determinar su nivel de carbohidratos unidos covalentemente a rLip2, para ello se utilizó una endo-glicosidasa, la péptido N-glicosidasa F (PNGasa F) (Sigma-Aldrich, P7367), enzima que rompe el enlace N-glicosídico entre el monosacárido GlcNAc y la asparagina (Tarentino *et al.*, 1985), el desarrollo de la experiencia se realizó como indica el distribuidor. El método consta de las etapas que se describen a continuación:

Desnaturalización de las lipasas:

Para que la cadena oligosacárida fuera accesible a la endoglicosidasa, rLip2 fue previamente desnaturalizada, para ello una alícuota de rLip2, conteniendo aproximadamente 100 µg de proteína, se diluyó en un tampón conteniendo SDS y 2-mercaptoetanol hasta obtener una concentración final de SDS 0,5 % (p/v) y 100 mM de 2-mercaptoetanol. La mezcla se incubó durante 5 min a 95 °C.

Desglicosilación con PNGasa F:

A la solución anterior se le añadió un volumen de tampón de concentración ajustada para obtener una disolución con las siguientes concentraciones finales: tampón fosfato sódico 50 mM (pH 7,2), EDTA 12,5 mM, NP-40 1%(p/v) y la PNGasa F (2 U/100 µg de proteína). La reacción enzimática se realizó a 37 °C durante 1 hora, la reacción se detuvo añadiendo tampón de muestra SDS-PAGE (1:1, v/v) calentando durante 3 min a 95 °C. El grado de desglicosilación se determinó corriendo la solución en un gel SDS-PAGE.

4.5.3.-Detección Inmunológica (Western-Blot).

Esta técnica consiste en la transferencia electroforética de proteínas desnaturalizadas (mediante calor y detergente) desde un gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa y la identificación y posterior visualización de las proteínas específicas mediante el uso de anticuerpos, en base a lo cual tenemos un límite de detección de picogramos de proteínas con una elevada especificidad Fig. 4.10.

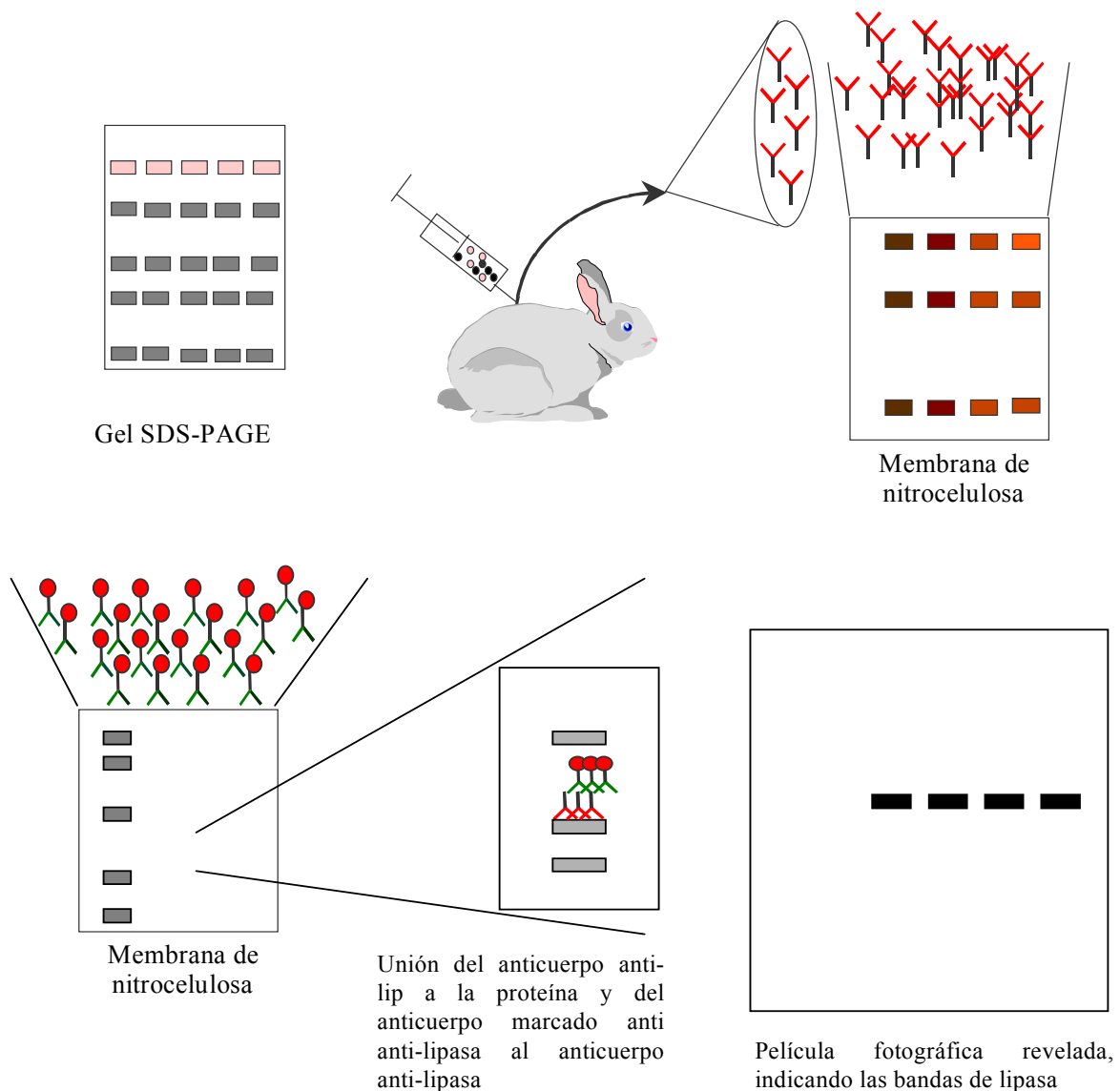


Fig. 4.10. Desarrollo del proceso de detección de proteínas western-blot. El proceso se lleva a cabo, como se indica en el esquema y se explica a continuación:

1. Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa: Tras la electroforesis desnaturalizante, en presencia de SDS, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa, usando una unidad NovaBlot (BioRAD), aplicando una intensidad de corriente de 150 mA por una hora. El tampón de transferencia se compuso de Tris·HCl 20mM, Glicina 150 mM y metanol 20% (v/v).
2. Bloqueo de la membrana de nitrocelulosa e incubación con el anticuerpo primario: se procedió a bloquear la membrana de nitrocelulosa con tampón salino (25 mM Tris·HCl pH 8.0; 125 mM NaCl) al 0,1% de tween 20 (TBS-T) con un 3% de leche desnatada (Oxoid ref. LP0031), durante una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Posterior a lo cual se incubó con el primer anticuerpo, poniendo el anticuerpo anti lipasa de *C. rugosa* (desarrollado en conejo) en la proporción de 1 a 500 disuelto en TBS-T al 0.1%, se deja incubar por 2 hora a temperatura ambiente, con agitación suave, al acabar este periodo se procede a los lavados, realizando 3 lavados con TBS-T (0.1%) por 5, 10 y 15 min, luego se dispone del segundo bloqueo, con leche desnatada al 3% en TBS-T, durante una hora a temperatura ambiente.
3. Incubación con el anticuerpo secundario: Se pone una concentración de anticuerpo anti- conejo de 1:10.000, desarrollado en este caso en cabra y marcado con peroxidasa, disuelto en TBS-T al 0.1%, se deja incubar por 2 horas a temperatura ambiente, con agitación suave. Posterior a lo cual nuevamente se procede a lavar 3 veces con TBS-T (0.1 %) 5, 10 y 15 min.
4. Detección: la detección se realiza mediante revelado fotográfico en un cuarto oscuro, siendo expuesta la membrana a una solución químioluminiscente conteniendo peroxidasa, esto durante 30 segundos luego se dispone al interior del *cassette* de revelado exponiendo la membrana a una película fotográfica, que es revelada con la respectiva batería de revelado fotográfico, lo que deja a la vista la impronta de las proteínas marcadas.

4.5.4.- Método colorimétrico de análisis de actividad lipásica.

Se utilizó para analizar la actividad lipásica de la enzima Lip2, el test *Lipase colorimetric assay* (Roche Diagnostics) optimizado para la enzima Lip2 de *C. rugosa* basado en el ataque de la enzima a un sustrato cromóforo específico de lipasa el cual, a través de una serie de reacciones encadenadas dan lugar a un producto coloreado (Fig. 4.11).

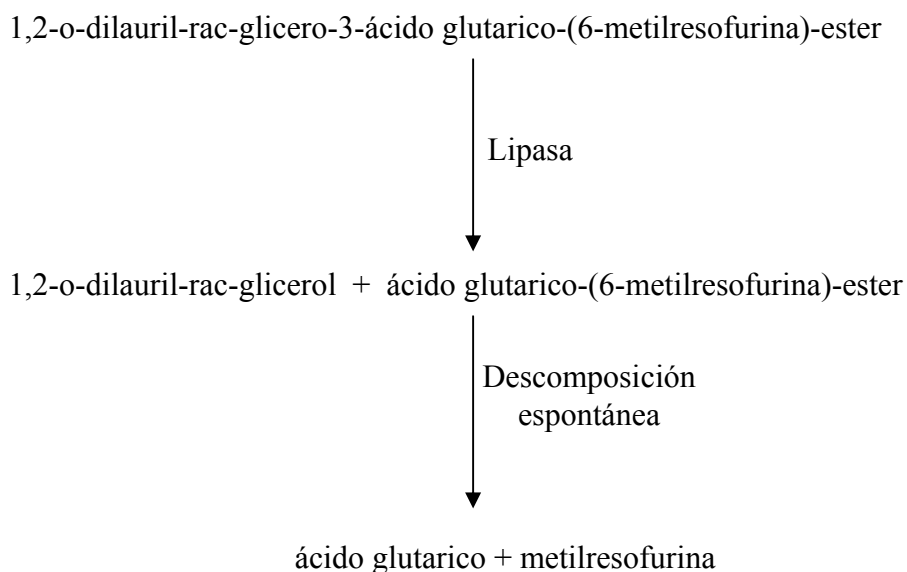


Fig. 4.11.- Esquema de reacción colorimétrica para la detección de actividad lipasa.

En una solución básica, el sustrato de la lipasa, 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-ácido glutarico-(6-metilresofurina)-ester, es descompuesto bajo la acción catalítica formando el 1,2-o-dilauril-rac-glicerol y el ácido glutárico-(6-metilresofurina)-ester, un producto intermedio inestable (Fig. 4.11). En solución alcalina, éste se descompone espontáneamente en ácido glutárico y metilresofurina. La metilresofurina es un colorante rojo, la intensidad cromática es directamente proporcional a la actividad lipásica, la cual se mide fotométricamente a una longitud de onda de 580 nm.

El análisis se realizó mezclando 0,5 mL de la muestra a analizar, previamente centrifugada para separar la biomasa, con 0,5 mL de tampón Tris·HCl 400 mM, pH 7,25, el cual contiene CaCl₂ 10 mM, y 0,3 mL del reactivo colorimétrico del test de análisis, Roche. La reacción se sigue a 580 nm, durante 8 min y a una temperatura de 37 °C en un espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary3 (Fig. 4.12), conectado a un

ordenador en donde se obtiene en línea la grafica de la absorbancia. La pendiente de recta (Abs/min), medida que se realiza en el intervalo de 4 a 7 minutos de reacción, con un rango de confianza del 95% entre 0,01 y 0,06, es proporcional a la actividad lipásica, si está por encima de valor indicado se diluyen las muestras con agua destilada, si la muestra de interés proviene de un liofilizado, se procede a disolver la muestra en agua destilada. A partir del dato de la pendiente, se cuantifica la actividad lipásica de la muestra mediante la recta de calibración (López *et al.*, 2001), que se ajusta a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad Lipásica (U/mL)} = -3,8289 + (978,9878 * m) \quad m = \text{pendiente (Abs/min)}$$

Una unidad de actividad lipásica (IUPAC) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol (μmol) de ácido graso por minuto de reacción; con lo que la actividad específica de la lipasa se expresa como μmol de ácido graso liberado por minuto y por miligramo de lipasa.



Fig. 4.12.- Espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary3, instrumento utilizado para el análisis de actividad lipásica y degradación de para-nitrofenoles.

4.5.5.- Obtención de concentrado de proteína rLip2 y liofilizado Lip2.

Concentrado líquido y recuperación de rLip2

Al finalizar la fermentación se procedió a la recuperación de la rLip2 del caldo de cultivo aplicando una estrategia clásica, consistente en la separación por centrifugación de la biomasa del sobrenadante de la fermentación utilizando una centrifuga Beckman J2-21 M/E, aplicando 8.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se microfiltró utilizando filtros de diámetro de poro de 0,45 μm (Millipore) para separar el remanente de biomasa, filtración llevada a cabo con un sistema de filtración formado por un matraz Kitasato y un sistema de vacío. Una vez el caldo de cultivo libre de biomasa, se procedió a la ultrafiltración tangencial mediante un sistema de ultrafiltración FILTRON con una membrana *cassette* de ultrafiltración *centrasette* 0,46 SQ.M/S SQ.FT de diámetro de poro adecuado (con un corte de peso molecular de 10 kDa en nuestro caso) para eliminar las proteínas de bajo peso molecular y concentrar la proteína de interés, para facilitar el paso de la solución con nuestra proteína por la membrana el sistema esta complementado por una bomba peristáltica *Masterflex I/P* modelo 7529700 (Fig. 4.13). Para realizar el proceso, el retenido final era de aproximadamente 500 mL, con este retenido se realizaron dos etapas de dia-ultrafiltración; partiendo del volumen inicial de 3,5 L alcanzado mediante dilución con tampón Tris-HCl pH 7.5 10 mM.

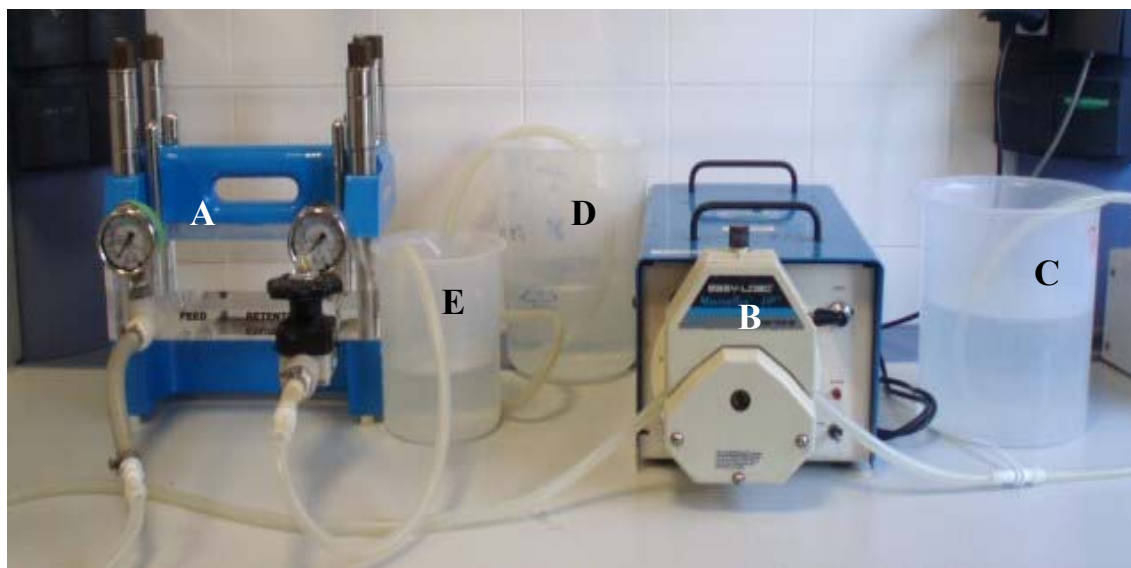


Fig. 4.13.- Sistema de ultrafiltración tangencial utilizado para purificación y concentración de rLip2. A: Filtron con membrana *cassette* con diámetro de poro de exclusión de 10 kDa, B: bomba peristáltica para optimizar el paso hacia el Filtron; C: caldo de cultivo sin biomasa; D: deposito de almacenamiento de residuo; E: retenido con proteínas sobre 10 kDa.

Liofilización

La liofilización es un procedimiento que consiste en una congelación de la muestra puesta en los recipientes del liofilizador, en nuestro caso la congelación se llevó a cabo sumergiendo los recipientes en anhídrido carbónico congelado (hielo seco) y acetona, congelación seguida de una deshidratación por sublimación que tiene lugar en los mismos recipientes donde se realiza el vacío, para lo cual se utilizó un liofilizador Virtis Sentry modelo Benchtop 5L equipado con una bomba de vacío Edwards modelo RV5 (Fig. 4.14), como prevención de riesgo se ha de considerar que la bomba de vacío en funcionamiento llega a los 90 °C, por lo cual se recomienda no tocarla, ni acercarse ningún objeto. El proceso de liofilización se llevó a cabo durante un periodo entre 24 y 48 horas, el extracto de rLip2 liofilizado fue almacenado a -20 °C, para posteriores utilidades.

Se realizaron ensayos con diversos estabilizantes en el proceso de liofilización (Tabla 4.9) siguiendo los mismos pasos de liofilización ya indicados.

Tabla 4.9.- Reactivos utilizados en estabilidad de rLip2 en el proceso de liofilización.

Reactivo	concentración	Proveedor	Referencia
Control sin aditivos			
Goma arábica	1 g/L	Panreac	142061
Lactosa	30 g/L	Panreac	131375
PEG 8000	1% w/v	Panreac	146224



Fig. 4.14.- Liofilizador Virtis Sentry modelo Benchtop 5L (A) y una bomba de vacío Edwards modelo RV5 (B), equipos utilizados en el tratamiento de las muestras de rLip2.

4.5.6.-Caracterización funcional de rLip2.

4.5.6.1.-Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad lipásica.

Para determinar el efecto de la fuerza iónica sobre la actividad lipásica se realizaron ensayos de actividad lipásica trabajando con un medio con la misma relación de sales que el medio Invitrogen en un rango creciente de concentraciones. La fuerza iónica fue medida, por la conductividad de la muestra, utilizando un pHmetro (Crisol, micro pH 2001). Los experimentos se realizaron para soluciones cuyas conductividades iban de 10 a 75 mS/cm y se siguió la actividad enzimática por un período de 60 horas.

4.5.6.2.-Efecto de la temperatura sobre la actividad lipásica.

Para la determinación de la temperatura óptima de reacción de la enzima rLip2 se procedió a realizar el análisis de actividad lipásica con el kit de detección Roche como se ha indicado anteriormente (sección 4.5.4), pero a distintas temperaturas, en un rango entre 20 y 70 °C con un intervalo de 5 grados. Se procedió a los ajustes de temperatura del espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary3, realizando 11 ensayos a distintas temperaturas y con el pH fijo en 7,25.

4.5.6.3.-Efecto del pH sobre la actividad lipásica.

Para la determinación del pH óptimo de reacción de la enzima rLip2 se procedió a realizar el análisis de actividad lipásica con el kit de detección Roche como se ha indicado anteriormente (sección 4.5.4), pero a distintos pHs, con lo cual se modificó el pH de trabajo en incrementos de 0,5 unidades desde pH de 5,0 a pH 9,0. Las soluciones tampón utilizadas se indican en las tablas 4.10 y 4.11, y el pH se verificaba utilizando un pHmetro (Crisol, micro pH 2001).

Tabla 4.10.- Tampones utilizados para el análisis de actividad lipásica en función del pH.

pHs	Tampón	Volumen	Volumen	Acido/Base	Volumen t
		mL (0,1 M)	mL	(0,1 M)	mL
5,0	A	25	12,5	NaOH	37,5
5,5	A	25	9	NaOH	34
6,0	B	25	22	NaOH	47
6,5	B	25	24	NaOH	49
7,0	B	25	25,5	NaOH	50,5
7,5	B	25	26	NaOH	51
8,0	C	25	10	HCl	35
8,5	C	25	2	HCl	27
9,0	C	25	N.S.	HCl	25

N.S. =no significativo

Tabla 4.11.-Tampones utilizados para realizar el ajuste de pH

Tampones	Preparación
A	100 mL 0,1 M potasio hidrogeno phtalato + volumen indicado en mL de NaOH (0,1 M)
B	100 mL 0,1 M KH_2PO_4 + volumen indicado en mL de NaOH (0.1 M)
C	100 mL 0,1 M Tris (hidroximetil) aminometano + volumen indicado en mL de HCl (0.1 M)

4.5.6.4.-Especificidad frente a triglicéridos y p-nitrofenoles.

Tanto, en el desarrollo de los análisis de degradación de triglicéridos como en la estabilidad (pH-Temperatura) de la enzima Lip2 recombinante (rLip2), se utilizó un pH-Stato (Fig. 4.14) para medir la actividad lipásica, en tanto que para el análisis de la degradación de *p*-nitrofenoles se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary3 (Fig. 4.12). En todos los casos se utilizó una solución de rLip2 con una concentración de proteína de 2,86 mg/mL.

4.5.6.4.1.- Especificidad frente a triglicéridos.

Los triglicéridos son acilgliceroles, un tipo de lípidos formados por una molécula de glicerol, que tiene esterificada sus tres grupos hidroxilo, por tres ácidos grasos saturados o insaturados. Los triglicéridos utilizados para el estudio de la actividad lipásica se presentan en la tabla 4.12. Para el análisis de cada triglicérido se utilizó un tampón de

emulsión tris HCl 5 mM (pH 7,0) conteniendo CaCl_2 0,1 M y goma arábica 0,5 % (p/v) a la cual se le adicionó el triglicérido correspondiente para obtener una concentración final de 20 mM, excepto para la triacetina que para los análisis de actividad lipásica requiere una concentración final de 1,3 M (Pernas 2003). La solución tampón con el triglicérido, en un volumen final de 100 mL, fué emulsionada utilizando un homogeneizador Ultra-turrax T25 (IKA Labortechnik) a 11.000 rpm durante 7 min. Esta emulsión era estable a temperatura ambiente durante un día de trabajo.

La actividad se determinó valorando los ácidos grasos producidos en la hidrólisis del triglicérido, catalizada por la enzima, manteniendo el pH constante mediante la adición en continuo de una base. Los ensayos de actividad se realizaron a 30°C en un pH-stato de la casa Methrom (Fig 4.15). En todos los casos, la mezcla de reacción (sustrato y tampón) se agitaba hasta un valor estable de pH (manteniendo éste mediante la adición de NaOH 0,01 N) y, a continuación, la reacción se iniciaba adicionando la cantidad adecuada de enzima (entre 5 y 100 μl).

Tabla 4.12.- Listado de triglicéridos, con sus principales características, utilizados para el análisis de la actividad lipásica de la lipasa rLip2.

Compuesto	Peso molecular	Densidad g/mL	Proveedor/ Referencia
Triacetina (C2)	218,20	1,16	Sigma W200700
Tributyryna (C4)	302,36	1,032	Sigma T8626
Tricaproyna (C6)	386,52	0,98	Sigma T0888
Tricaprylina (C8)	470,68	0,956	Fluka 91039
Tricaprina (C10)	554,84	solido	Sigma T7517
Tripalmitina (C16)	807,32	solido	Sigma T5888
Tristearina (C18)	891,48	solido	Sigma T5016
Trioleina (C18:1)	885,43	0,91	Sigma T7140

El pH stato se compone de 7 partes:

1. Impulsómetro: es la parte del equipo con la que fijamos el pH de trabajo, con este modulo podemos activar y detener la señal de control del pH, es decir, de adición de NaOH (valoración).
2. pHmetro: mide el pH de la muestra e indica la variación del pH con respecto al pH fijado en el impulsometro.

3. Recipiente de la muestra: corresponde a un depósito de vidrio, con “camisa” para el control de temperatura, en el cual se adiciona la muestra.
4. Agitador magnético: mantiene homogénea la muestra y permite que al adicionar NaOH se alcance el equilibrio de pH con mayor velocidad.
5. Dosificador: depósito de NaOH y una bureta con controlador de caudal con la que se agrega la base al depósito de la muestra, cuando el impulsómetro da la señal de adición.
6. Impresora: imprime la curva de valoración de la formación de ácido en la muestra. En nuestro caso al degradar triglicéridos con lipasas se liberan ácidos grasos.
7. Baño termostático: permite mantener constante la temperatura de la muestra a analizar.



Fig. 4.15.- Fotografía del pH-Stato utilizado para el análisis de la degradación de triglicéridos y para los estudios de estabilidad (pH-Temperatura) de la enzima rLip2.

4.5.6.4.2.- Especificidad frente a *p*-nitrofenoles.

Los *para*-nitrofenoles, son compuestos nitrofenólicos con un ácido graso en la posición *para* con unión éster entre el ácido graso y el nitrofenol. Para analizar la actividad esterásica de nuestra proteína (rLip2), aplicada a la degradación de *p*-nitrofenoles se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary3 (Fig. 4.12), de manera que se

podiese medir la aparición de los productos de hidrólisis durante 10 minutos a una temperatura de reacción de 30° C a 348 nm de longitud de onda, punto isobéptico del par *p*-nitrofenol/*p*-nitrofenolato. (El punto isobéptico esta dado por la longitud de onda a la cual la intensidad de emisión de una muestra no cambia durante una reacción química o cambio físico (Verhoeven, 1999). Se adicionó entre 5 y 100 µL de rLip2 a los 5 min de iniciado el análisis, para así detectar la autólisis del *p*-nitrofenol utilizado en cada reacción (tabla 4.13). La reacción de los *p*-nitrofenoles se llevó a cabo en una solución tampón constituida por tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,0; conteniendo triton X-100 0,32 % p/v, y acetona 4,0% v/v; con una concentración final del *p*-nitrofenol de 1 mM

Tabla 4.13.- Listado de *p*-nitrofenoles (1mM), con sus principales características, utilizados para el análisis de la actividad esterásica de la lipasa rLip2.

p-Nitrofenol	Peso Molecular	Densidad g/ml	Proveedor y referencia
Propionato (C3)	195,17		Sigma N3377
Butirato (C4)	209,20	1,19	Sigma N9876
Hexanoato (C6)	237,25		Sigma N0502
Octanoato (C8)	265,30	1,095	Fluka 21742
Decanoato (C10)	293,36		Sigma N0252
Dodecanoato (C12)	321,41		Fluka 61716
Palmitato (C16)	377,52		Sigma N2752

4.5.6.5.- Estabilidad enzimática a bajas temperaturas.

Se realizaron los estudios para tres concentraciones de proteína total a partir de un stock diafiltrado (200 mg/L) tal como se muestra en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14.- Concentraciones y sus respectivas actividad lipásica para ensayos de estabilidad.

Muestra	Proteína total (mg/L)	Act. lipásica (U/mL)	Act. lipásica esp. (U/mg)
1	15	42	2800
2	100	58	580
3	200	52	260

4.5.6.5.1.- Estabilidad enzimática a 4° C.

Las soluciones con las concentraciones definidas en la tabla 4.14, se almacenaron a 4°C en viales de 50 mL con un volumen de solución de 30 mL, de los cuales se tomaron 500 µL para el análisis de actividad lipásica cada siete días durante 49 días.

4.5.6.5.2.- Estabilidad enzimática a -20 °C.

Las soluciones con las concentraciones definidas en la tabla 4.14, se almacenaron a -20° C en siete viales de 20 mL con un volumen de solución de 10 mL, para cada concentración de proteína. Los viales se procedieron a descongelar de forma sistemática, uno cada semana, poniéndolos a temperatura ambiente durante 30 min y se tomaba 500 µL para el análisis de actividad lipásica.

4.5.6.5.3.- Efecto provocado por la congelación y descongelación sucesivas sobre la actividad lipásica.

Las soluciones con las concentraciones definidas en la tabla 4.14, se almacenaron a -20° C en viales de 50 mL con un volumen de solución de 30 mL, de los cuales se tomaron 500 µL para el análisis de actividad lipásica cada siete días durante 49 días. Los viales se descongelaban poniéndolos a temperatura ambiente durante 30 min y después de la toma de muestra para análisis de actividad lipásica nuevamente se congelaban a -20° C, por siete días hasta la nueva toma de muestra.

4.6.- Estudio de la estabilidad de rLip2 en solución.

Para determinar la estabilidad del preparado en solución de rLip2 frente a pH y temperatura se realizó un diseño de experimentos en el que la muestra fue tratada y analizada de la siguiente manera:

1. Se concentra la enzima, si es necesario, mediante un equipo de ultrafiltración con una membrana de 30 kDa de Millipore.
2. Se monta el sistema pH-stato y el baño termostático para los ensayos de estabilidad.
3. Realizar PD10 (“Desalting Columns” Amersham-Biosciences), para poner la enzima con el tampón al pH adecuado.
 - Lavar la columna con 25 ml tampón adecuado.

- Pasar exactamente 2,5 ml de rLip2 (lo que sale en este paso **NO** es rLip2).
 - Lavar con 3,5 ml del tampón adecuado, obteniéndose la rLip2.
5. Rápidamente se pone a incubar a la temperatura correspondiente durante 1 hora, en un baño termostatzado.
 6. Se realiza el ensayo de actividad a 30° C, con TB 114 mM tal como se especifica en el apartado 4.5.6.4.1.

4.7.- Diseño del plan Factorial.

Se utilizó un diseño ortogonal de segundo orden para estudiar el efecto combinado del pH y la temperatura sobre la estabilidad de la rLip2 (Akhazarova, S. *et al.*, 1982). El diseño consistió en 13 experimentos con 4 puntos factoriales (2^2) y 4 puntos axiales para formar un diseño centrado con $\alpha = 1.267$, realizándose 5 análisis en el punto central que se utilizan como réplicas. El rango de pH analizado se situó entre 5 y 9, mientras que el de temperatura se situó entre los 30°C y 50°C, rangos seleccionados de acuerdo a la información de la que previamente se disponía. La significación de los coeficientes (calculados por el método de mínimos cuadrados) se verificó mediante el test de t-Student con $\alpha \leq 0,05$. La consistencia del modelo se verificó por medio del análisis de varianza, asimismo con $\alpha \leq 0,05$, aplicado simultáneamente a las dos relaciones de cuadrados medios siguientes:

$$F_1 = \frac{\text{CMM}}{\text{CME}} \quad \text{modelo aceptable si } F_1 \leq F_{den}^{num}$$

$$F_2 = \frac{\text{CMM}}{\text{CME}} \quad \text{modelo aceptable si } F_2 \leq F_{den}^{num}$$

Donde: CMM= cuadrados medios del modelo
 CME= cuadrados medios del error total

Las correspondientes sumas de cuadrados y grados de libertad se obtienen como se indica en la tabla 4.15.

Tabla 4.15.- Sumas de cuadrados y grados de libertad para el diseño del plan factorial.

	Sumas de cuadrados	Grados de libertad
Modelo (SCM)	$\sum (\hat{y}_i - y)^2$	$C_s - 1$
Error (SCE)	$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n - C_s$
Error experimental (SCE exp)	$\sum (y_i - \bar{y}_i)^2$	$n_0 - C_s$
Desajuste (SC desajuste)	$\sum (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2$	$n - C_s - (n_0 - 1)$
Modelo + desajuste (SC [M+desajuste])	$\sum (\bar{y}_i - y)^2$	$n - n_0$
Total (SCT)	$\sum (y_i - \bar{y})^2$	$n - 1$

Siendo:

n: número total de observaciones, en principio distribuidas en r grupos de réplicas, con n_1, n_2, \dots, n_r réplicas por grupos ($n_1 + n_2 + \dots + n_r = n$). Si sólo se realizan réplicas (n_0) en el centro de dominio, se tendrá que $n - r = n_0 - 1$.

C_s : número de coeficientes significativos del modelo

y_i : Observaciones experimentales

\bar{y}_i : Media de las réplicas de cada grupo. Las observaciones aisladas cuentan como una medida a la que se asocian un número nulo de grados de libertad.

\hat{y}_i : Valores esperados de acuerdo con el modelo propuesto

\bar{y} : Media global de las n observaciones

El coeficiente de determinación en su forma convencional:

$$r^2 = \frac{\text{SCM}}{\text{SCT}}$$

Se corrige, para penalizar el aumento de variables independientes, de acuerdo con la expresión:

$$r^2 \text{ ajustado} = 1 - \frac{\text{SCE} * \text{grados de libertad totales}}{\text{SCT} * \text{grados de libertad del error}}$$

Para contemplar la posibilidad de términos cuadráticos es preciso ampliar el número de observaciones, añadiendo al diseño primitivo, por cada variable con posible efecto cuadrático, los pares de puntos $(-\alpha, 0, \dots, 0)$ y $(\alpha, 0, \dots, 0)$. En tal caso puede optarse por la observación de la ortogonalidad, o por el trabajo en un ámbito de respuesta isovariante (diseño rotatable).

En el primer caso, los valores de α vienen dados (siendo K el número de variables y n_0 el de réplicas del punto central) por las soluciones positivas a la ecuación:

$$\alpha^4 + 2^k \alpha^2 - 2^{(k-1)}(K+0,5n_0) = 0$$

Para que la matriz de varianzas-covarianzas de los coeficientes mantenga el carácter diagonal, los valores ya codificados de la columna cuadráticas (X^2_{oj}) de la matriz de variables independientes se transforman ahora (Z^2_{oj}) mediante la expresión:

$$Z^2_{oj} = X^2_{ij} - \frac{\sum X^2_{ij}}{n}$$

Tal transformación únicamente altera los valores del término independiente b_0 y de su varianza $\text{Var}(b_0)$, que pasan a ser a_0 y $\text{Var}(a_0)$. La obtención de los primitivos se lleva a cabo mediante:

$$b_0 = a_0 - \frac{\sum X^2_{ij}}{n} (b_{11} + b_{22} + \dots + b_{kk})$$

$$\text{Var}(b_0) = \text{Var}(a_0) - \left[\frac{\sum X^2_{ij}}{n} \right]^2 (b_{11} + b_{22} + \dots + b_{kk})$$

siendo los b_{ij} los coeficientes de los términos cuadráticos.

De optarse por el diseño rotatable, en la matriz experimental los puntos se distribuyen sobre una circunferencia (esfera, hiperesfera) circunscrita a un cuadrado (cubo, hipercubo) cuyo lado (arista) tiene el valor $1-(-1)=2$. en tal caso, los valores de α se obtienen mediante:

$$\alpha = \sqrt{(\sqrt{2})^2}$$

Dado lo anterior, el diseño de experimento nos indica que se han de realizar 13 ensayos dentro del diseño ortogonal de experimentos (Tabla 4.16), para la estabilidad de rLip2 sobre pH y temperatura.

Tabla 4.16.- Parámetros a utilizar en base al diseño del plan factorial, para los ensayos de análisis combinado de estabilidad de rLip2 sobre pH y Temperatura bajo condiciones solubles e inmovilizada.

Muestra	pH	pH normalizado	Temperatura °C	Temperatura normalizada
1	5,0	-1.267	40,0	0
2	5,4	-1	32,1	-1
3	5,4	-1	47,9	1
4	7,0	0	30,0	-1.267
5	7,0	0	40,0	0
6	7,0	0	40,0	0
7	7,0	0	40,0	0
8	7,0	0	40,0	0
9	7,0	0	40,0	0
10	7,0	0	50,0	1.267
11	8,6	1	32,1	-1
12	8,6	1	47,9	1
13	9,0	1.267	40,0	0

En base a los resultados obtenidos en los ensayos derivados del diseño de experimentos y a partir del valor del porcentaje de actividad residual de la rLip2 se obtuvo la ecuación empírica que describe el porcentaje de actividad residual de la lipasa recombinante en solución, con dicha ecuación se grafico la superficie de respuesta obtenida, extrapolada hasta el valor de $\alpha = 1.5$.

4.8.- Inmovilización de rLip2 sobre el soporte EP100.

Se optó por una inmovilización vía adsorción de la rLip2 sobre EP100, soporte microporoso de polipropileno, suministrado por la casa AKZO Novel, Holanda, de naturaleza hidrofóbica y con una elevada área específica (Capellas *et al.*, 1996). Para el proceso de adsorción de rlip2 sobre EP100, se procedió siguiendo el siguiente protocolo:

1. Disolver la cantidad deseada de enzima a inmovilizar en una solución tampón Tris·HCl 400 mM, pH 7,5. Mantener en agitación magnética durante 1 hora y luego centrifugar a 12000 rpm durante 20 min.
2. Pesar la cantidad de soporte (EP 100) necesario y humedecer con etanol a razón de 3 mL/g de soporte, filtrar el soporte.
3. Añadir la solución de enzima, dejar agitando la mezcla en un roller Movil-Rod de 24 a 72 horas.
4. Monitorizar la actividad lipasa hasta fin del periodo de incubación.
5. Finalizado el periodo de inmovilización filtrar y lavar 2 veces con solución tampón Tris·HCl. 400 mM, pH 7,5.

Guardar la enzima inmovilizada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.8.1.- Estudio de la estabilidad de rlip2 inmovilizada sobre EP100.

Para determinar la estabilidad del preparado inmovilizado de rLip2 frente a pH y temperatura se realizó un diseño de experimentos ortogonal de segundo orden siguiendo la misma metodología de la enzima en solución explicada en el apartado 4.7. La única diferencia fue que la actividad residual del preparado inmovilizado se determinó mediante el test de actividad lipásica Roche, debido a no disponer del equipo adecuado para realizar el test de actividad de la tributirina que se había realizado en el laboratorio de la Dra. Rua.

Para lo cual se utilizó 5 mg de EP100+rLip2, con 500 μL del tampón para ajustar al pH de interés, lo cual se incubo en un baño termorregulado a la temperatura correspondiente durante 1 hora, luego se procedió a realizar el ensayo de actividad lipásica, adicionando el tampón de reacción y 300 μL del reactivo colorimétrico Roche. La reacción se siguió a 580 nm, durante 8 min y a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary3 aplicando agitación mediante una barra agitadora adecuada para la cubeta de análisis y la opción de agitación magnética del cary3.

En base a los resultados obtenidos en los ensayos derivados del diseño de experimentos y a partir del valor del porcentaje de actividad residual de la rLip2 se obtuvo la ecuación empírica que describe el porcentaje de actividad residual de la lipasa recombinante inmovilizada, con dicha ecuación se graficó la superficie de respuesta obtenida, extrapolada hasta el valor de $\alpha = 1.5$.

4.9.- Análisis de los enantiómeros del ibuprofeno y TPCH y sus respectivos ésteres.

4.9.1- Análisis de los enantiómeros y ésteres del ibuprofeno.

La reacción de síntesis seleccionada para la esterificación de ibuprofeno (Fig. 4.16) fue llevada a cabo bajo las siguientes condiciones:

Ácido: ibuprofeno 25 mM; alcohol: butanol 25 mM; medio: isooctano 10 mL; catalizador: rLip2 inmovilizada en EP100 100 mg; temperatura: 37 °C; agitación: 250 rpm.

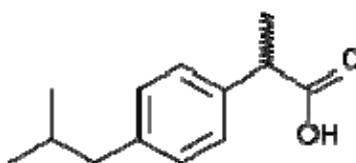


Fig.- 4.16. Esquema del ibuprofeno.

Para el análisis de ibuprofeno y sus ésteres se utilizó el siguiente protocolo:

Instrumentación

- Cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard 1090, con detector DAD a 226 nm.

Eluyente

Como fase móvil se utiliza hexano, isopropanol, ácido trifluoroacético (98:2:0,1).

Condiciones cromatográficas

- Columna: fase normal Chiracel OD, de Daicel Chemical Industries LTD.
- Caudal: isocrático de 1,0 mL por min.
- Volumen de inyección: 5 µL.
- Tiempo de análisis: 20 min.
- Temperatura: Ambiente.

Preparación de las muestras

Las muestras que se desean analizar deben estar previamente filtradas por una membrana de 0,45 µm. Estas deben quedar totalmente transparentes y sin partículas en suspensión. La inyección se realiza directa sin diluciones.

4.9.2.- Análisis de los enantiómeros y ésteres del TPCH.

La reacción de síntesis seleccionada para la esterificación del tras- 2-fenil-1-ciclohexanol (TPCH) (Fig. 4.17) se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones (Sánchez, A. *et al.*, 2000):

Alcohol: TPCH 25 mM; ácido: ácido propionico 25 mM; medio: isooctano 10 mL; catalizador: Lip2r inmovilizado en EP100 100 mg; temperatura: 37 °C; agitación: 250 rpm.

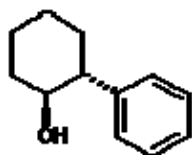


Fig 4.17.-Esquema del tras 2 fenil ciclohexanol

Para el análisis de TPCH y sus ésteres se utilizó el siguiente protocolo:

Instrumentación:

- Cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard 1090, con detector DAD a 215 nm.

Eluyente:

Como fase móvil se utiliza hexano, isopropanol, (98:2)

Condiciones cromatográficas:

- Columna: fase normal Chiracel OD, de Daicel Chemical Industries LTD.
- Caudal: isocrático de 1,0 ml por minuto.
- Volumen de inyección: 10 µL.
- Tiempo de análisis: 15 minutos.
- Temperatura: Ambiente.

Preparación de las muestras:

Las muestras que se desean analizar deben estar previamente filtradas por una membrana de 0.45 µm de diámetro de poro, para eliminar impurezas que puedan afectar a la columna. Estas deben quedar totalmente transparentes y sin partículas en suspensión. La inyección se realiza directa sin diluciones.

4.9.3.- Parámetros de las reacciones quirales.

Para realizar un seguimiento de las reacciones quirales realizadas, es necesario definir diferentes parámetros (Chen *et al.*, 1982) que se detallan a continuación.

➤ **Conversión total (X):**

$$X = \frac{C_{ester}}{C_{ester} + C_r + C_s} (x100)$$

Siendo C_{ester} la concentración total de éster formado y C_r y C_s , las concentraciones de los enantiómeros R y S del reactivo respectivamente.

En el caso de reacciones con elevada enantioselectividad se puede asumir que la conversión respecto al enantiómero que reacciona (X_A) es aproximadamente: $X_A = 2X$, es decir, suponer que toda la conversión se refiere a uno de los dos enantiómeros. Ambos valores, X y X_A tomarán valores desde 0 a 100. En el caso de enantioselectividad perfecta y reacción completa: $X = 50\%$ y $X_A = 100\%$.

➤ **Exceso enantiomérico (EE):**

$$EE_r = \frac{C_r - C_s}{C_r + C_s} (x100) \qquad EE_s = \frac{C_s - C_r}{C_r + C_s} (x100)$$

El exceso enantiomérico siempre se refiere a uno de los enantiómeros, y puede referirse al producto o al reactivo. En el caso estudiado, se referirá al exceso enantiomérico del reactivo. El exceso enantiomérico tomará valores entre el 0 y el 100%.

➤ **Factor Enantiomérico (EF):**

$$EF = \frac{EE}{EE_T} \qquad EE_T = \frac{X}{(100-X)} (x100)$$

Este parámetro desarrollado por López Belmonte *et al.*, 1997, permite evaluar la enantioselectividad de una forma sencilla. Se calcula como el cociente entre el exceso

enantiomérico experimental (EE) y el exceso enantiomérico teórico (EE_T) el cual corresponde al valor del exceso enantiomérico que habría si sólo hubiese reaccionado el enantiómero de velocidad más rápida. De esta forma, un valor del factor enantiomérico de 1 significa enantioselectivamente perfecta, mientras que un valor de 0 corresponde a una ausencia de resolución.

5.-Resultados

Los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente investigación doctoral, han permitido la síntesis del gen sintético *lip2* y su expresión en *Pichia pastoris*. Además, se han llevado a cabo estudios de fermentación y recuperación que han permitido hacer una caracterización de la enzima Lip2 recombinante y su comparación con la enzima nativa. Así mismo se ha estudiado su aplicación en reacciones enantioméricas de productos de interés para la industria farmacéutica, como son las síntesis enantioselectivas de los ésteres de trans-2-fenil-1-ciclohexanol (TPCH) y el ácido 2-(p-isobutilfenil) propiónico (ibuprofeno).

5.1.- Síntesis y clonación del gen *lip2*.

5.1.1. Síntesis del gen *lip2*.

La levadura *C. rugosa* produce de forma natural una mezcla de isoenzimas con distinto perfil según las condiciones de cultivo, substrato inductor y cepa productora. En la mayoría de estudios con lipasas comerciales, se han detectado mayoritariamente Lip1 y Lip3 (Lee *et al.*, 2002), si bien en nuestro grupo de investigación en producciones con la cepa ATCC14830 de *Candida rugosa* se han detectado principalmente Lip2 y Lip3 (Sánchez *et al.*, 1999); los extractos comerciales también presentan las lipasas Lip2, Lip5 y Lip4 en menores cantidades (Lee *et al.*, 2002). Esta familia de enzimas presentan pesos moleculares (desde 56,96 kDa para Lip5 hasta 57,74 kDa para Lip2) y punto isoeléctrico (entre 4,5 y 5,7) cercanos entre si, por lo que la obtención de isoformas puras presenta dificultades importantes (Lotti *et al.*, 1994, Ferrer *et al.*, 2001). Una alternativa atractiva para la obtención de isoenzimas de lipasas de *C. rugosa* libres de otras actividades lipásicas y esterásicas contaminantes sería su producción recombinante. No obstante, esta estrategia presenta una dificultad importante derivada de la lectura del codón CUG en *C. rugosa*, codón que en el código genético universal es leído como leucina, pero que *C. rugosa* lo traduce como serina (Ferrer *et al.*, 2001).

Para resolver esta problemática orientada a la expresión de Lip2 en forma recombinante, se han presentado dos estrategias moleculares utilizando como herramienta operativa la técnica PCR. Por una parte, el grupo de Lee *et al.*, (2002) realizó mutagénesis dirigida para los 19 codones “anormales” de los 45 codones de serina del gen *lip2* de *C. rugosa*, estos codones fueron adaptados para la expresión funcional del gen *lip2* en *Pichia pastoris*. Por otra parte, en el presente estudio se optó por realizar la síntesis integral del gen *lip2* de *C. rugosa* clonándolo inicialmente en el plásmido pUC19 (Fig. 5.1).

Ello permite, además de cambiar todos los codones de serina, adaptar el resto de codones de *lip2* a codones más usados en *P. pastoris* (Fig 5.2, Tabla 8.2 y 8.3 en Anexo). Esta estrategia de síntesis *in vitro* de genes basada en la técnica de la PCR para su óptima expresión en *P. pastoris* también fue utilizada con éxito en el caso de otra lipasa de *C. rugosa*, concretamente para la expresión recombinante de Lip1 por Brocca y col., en 1998. Así, el gen de la proteína Lip2 de *C. rugosa*, con 1605 pares de bases que codifican para 534 aminoácidos en la proteína madura, fue traducido para su correspondiente secuencia aminoacídica. A ésta secuencia se le realizó una traducción reversa, es decir, se implementó la secuencia génica del uso de codones para *P. pastoris*, por lo cual se realizaron los cambios en todos los codones de poco uso en *P. pastoris* incluyendo todos los codones no universales que codifican para serina en *C. rugosa* (CTG), por codones universales y de mayor frecuencia de uso en *P. pastoris* (Fig. 5.2), diseñándose así de nuevo la secuencia nucleotídica teórica del gen *lip2* que ahora se expresó en *P. pastoris* (Fig. 5.2). Con base a esta nueva secuencia, la cual presento un 27,7% de diferencia respecto a la secuencia original del gen *lip2* de *C. rugosa*, se sintetizó el nuevo gen *lip2 in vitro* mediante técnicas de PCR con los sitios de restricción adyacentes para las endonucleasas *Eco* RI y *Hind* III y fue ligado al plásmido pUC19 previamente linearizado con las mismas enzimas. La síntesis del gen *lip2* y su clonaje en pUC19 fue realizada por la empresa Biospring (<http://www.biospring.de>) con base a nuestro diseño.

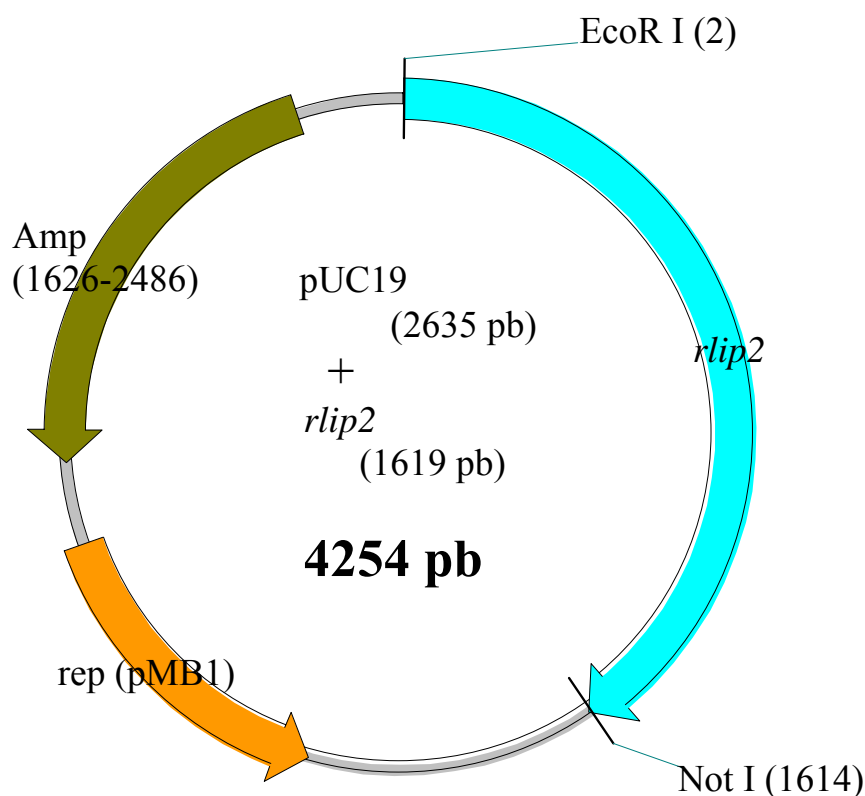


Fig. 5.1.- Esquema del plásmido pUC19 con el gen *lip2*. Se indica en la figura la resistencia a ampicilina, que otorga el plásmido, el gen *lip2* y las enzimas de restricción entre las cuales está el gen *lip2*.

Dado que *P. pastoris* secreta una cantidad mínima de proteínas endógenas y que las características físico-químicas y estructurales de rLip2 permiten, en principio, una fácil recuperación utilizando membranas de ultrafiltración de diámetro de poro adecuado (con un corte de peso molecular de 10 kDa en nuestro caso), y en el caso que fuese necesaria una mayor purificación usando la cromatografía de interacción hidrofóbica (ver introducción), no se dispuso que la enzima se sintetizara fusionada a una cola de histidinas para facilitar su purificación mediante cromatografía de afinidad a metales quelados; esta estrategia sólo se llevó a cabo cuando se decidió expresar intracelularmente *lip2* en *E. coli* (ver apartado 5.4.2.1), ya que el proceso de purificación se prevé difícil. De esta manera, se redujo al mínimo el número de residuos adicionales en la Lip2 recombinante (rLip2) respecto a su enzima homóloga nativa (nLip2), minimizando al máximo las posibles interferencias en la conformación y actividad de la enzima.

```

gaa ttc gca cca aca gct act tta gct aac gga gac act ata acc gga tta aac gcc atc gtt aat
E F A P T A T L A N G D T I T G L N A I V N
gag aaa ttt ttg ggc atc cca ttt gct gaa cca ccg gtg ggc acc tta aga ttc aaa cct cca gtt
E K F L G I P F A E P V G T L R F K P P V
cct tat tcc gcc tcc tta aat ggt caa cag ttc act tcg tac gga cca tcc tgt atg cag atg aat
P Y S A S L N G Q Q F T S Y G P S C M Q M N
cca atg gga tcc ttc gaa gat act cta ccc aaa aat gca ctg gat ctg gtg ttg cag tca aag atc
P M G S F E D T L P K N A L D L V L Q S K I
ttt cag gtc gtg tta cca aat gat gaa gac tgc ctc aca att aac gta atc aga cct cca ggt acc
F Q V V L P N D E D C L T I N V I R P P G T
cgt gca agt gcg ggt ttg cct gta atg ctt tgg att ttc gga ggt ggt ttc gaa ctg ggt ggt agt
R A S A G L P V M L W I F G G G F E L G G S
tct cta ttc ccg ggt gac caa atg gtg gcc aaa agc gtg ctc atg ggc aaa ccg gtc atc cac gtt
S L F P G D Q M V A K S V L M G K P V I H V
tcg atg aac tac aga gta gct tcc tgg gga ttt ctg gca ggg ccc gat att caa aat gaa ggt tcc
S M N Y R V A S W G F L A G P D I Q N E G S
ggt aac gct ggt cta cat gac caa aga tta gct atg caa tgg gtg gca gac aat ata gcg gga ttt
G N A G L H D Q R L A M Q W V A D N I A G F
ggt ggg gat cct agt aaa gtg aca att tat gga gag tcg gcc ggt tct atg tcc act ttc gtt cat
G G D P S K V T I Y G E S A G S M S T F V H
ttg gtg tgg aac gat gga gat aac acc tat aac ggt aaa cca tta ttc aga gcc gct att atg cag
L V W N D G D N T Y N G K P L F R A A I M Q
agc gga tgt atg gtc cct tct gac ccc gta gat gga aca tat gga act gaa ata tac aac caa gtt
S G C M V P S D P V D G T Y G T E I Y N Q V
gtt gcc tcc gct ggt tgt ggt tct gca tct gat aag ttg gcc tgt cta cga ggt ttg tca caa gac
V A S A G C G S A S D K L A C L R G L S Q D
act ctt tac cag gca aca agc gat acc ccc ggg gtt ttg gcc tac ccc tcc ttg agg ctg tcc tat
T L Y Q A T S D T P G V L A Y P S L R L S Y
ctt cct aga ccc gat ggt acc ttt att acc gac gac atg tac gca cta gtg cga gat gga aag tac
L P R P D G T F I T D D M Y A L V R D G K Y
gca cat gtt cct gtt att atc ggt gat cag aat gat gaa ggc acc ctt ttc gga cta tca agt ttg
A H V P V I I G D Q N D E G T L F G L S S L
aac gtt acc acc gat gct caa gcc cgg gct tac ttc aag caa agt ttt att cat gcc tcc gat gcc
N V T T D A Q A R A Y F K Q S F I H A S D A
gag att gat acc cta atg gct gcc tac acg agt gat att act caa ggt tca cct ttc gac acc ggt
E I D T L M A A Y T S D I T Q G S P F D T G
att ttt aat gct att act ccc caa ttt aaa aga att agt gcc ctg ctt gga gat ctt gca ttc aca
I F N A I T P Q F K R I S A L L G D L A F T
ttg gca cgt agg tat ttc ttg aat tat tac cag gga ggt acc aag tac tct ttc ctg tca aaa cag
L A R R Y F L N Y Y Q G T K Y S F L S K Q
tta tca ggc ttg ccg gtc ctg gga acc ttc cac gga aat gac atc ata tgg caa gat tat ttg gtt
L S G L P V L G T F H G N D I I W Q D Y L V
gga agc ggc tca gtt ata tac aat aat gca ttc att gct ttt gcg aat gat cta gac cca aat aaa
G S G S V I Y N N A F I A F A N D L D P N K
gct ggc ctc tgg acg aac tgg cca aca tac acc agt tct tcc cag tcc gga aac aac ttg atg caa
A G L W T N W P T Y T S S S Q S G N N L M Q
atc aat ggc cta ggt tta tat act ggc aag gac aac ttt aga cca gat gct tac agt gcc ctc ttt
I N G L G L Y T G K D N F R P D A Y S A L F
agt aat ccc cca tca ttt ttt gta tag gcg gcc gca agc ttc ag
S N P P S F F V Stop

```

Fig. 5.2.- Secuencia del gen *lip2* optimizada para ser expresada en *Pichia pastoris* y su correspondiente secuencia aminoácídica. Las secuencias marcadas en verde indican las dianas para las enzimas de restricción, *EcoRI*, *Not I* y *Hind III* respectivamente, el residuo marcado en azul corresponde al extremo N-terminal de la Lip2 madura nativa, las S indican las serinas cambiadas, la secuencia en negrita y cursiva indica la secuencia stop para la traducción del gen *lip2*, codificación de aminoácidos con letras en tabla 8.1 en anexo.

5.1.2.- Subclonación del gen *lip2* sintético en el vector de expresión pPICZ α

Generalmente, la clonación de vectores de expresión en *P. pastoris* se basa en un protocolo de integración en el genoma de dicho organismo del vector de expresión. Estos vectores son vectores llamados lanzadera (*shuttle vectors*), es decir, que pueden ser clonados en *E. coli* y replicarse en este huésped de manera autónoma, para luego ser subsecuentemente traspasados a *P. pastoris* mediante transformación con el vector previamente purificado y linearizado (Higgins *et al.*, 1998). Nuestro caso no es la excepción: Se subclonó el gen *lip2* sintético (*rlip2*) desde el plásmido pUC19 (Fig. 4.3 en materiales y métodos) al plásmido pPICZ α (Fig.4.4 en materiales y métodos). Para lo cual, se amplificó el plásmido pUC19*rlip2* en *E. coli*, posterior a lo cual se purifico y se procedió a realizar la extracción plasmidial; el plásmido pUC19*rlip2* fue digerido con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Not* I, generándose la liberación del gen (purificación) y su posterior ligación en el plásmido pPICZ α previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, así quedo conformado el plasmido pPICZ α *rlip2*. En la figura 5.3 se describe la estrategia global de la formación del plásmido pPICZ α *rlip2*.

La inserción de la diana *Eco*RI comporto la incorporación de dos residuos de aminoácidos (EF) al extremo N-terminal de la enzima rLip2 madura (Fig 5.2); además, esta secuencia insertó inmediatamente después de la región codificadora de la señal de secreción del factor alfa de *S. cerevisiae* de pPICZ α , permitiendo así la secreción del producto recombinante (con la secuencia N-terminal EFAPTA). Con esta ligación se transformó *E. coli* DH5 α y se seleccionaron transformantes resistentes a zeocina, de los cuales se purificó el plásmido pPICZ α *rlip2*. Una vez comprobado mediante análisis de restricción y secuenciación que la construcción del plásmido pPICZ α *rlip2* y la secuencia del inserto era correcta, se purificó DNA plásmidico suficiente para ser linearizado con la enzima de restricción *Sal*I y utilizado en la transformación de *P. pastoris*.

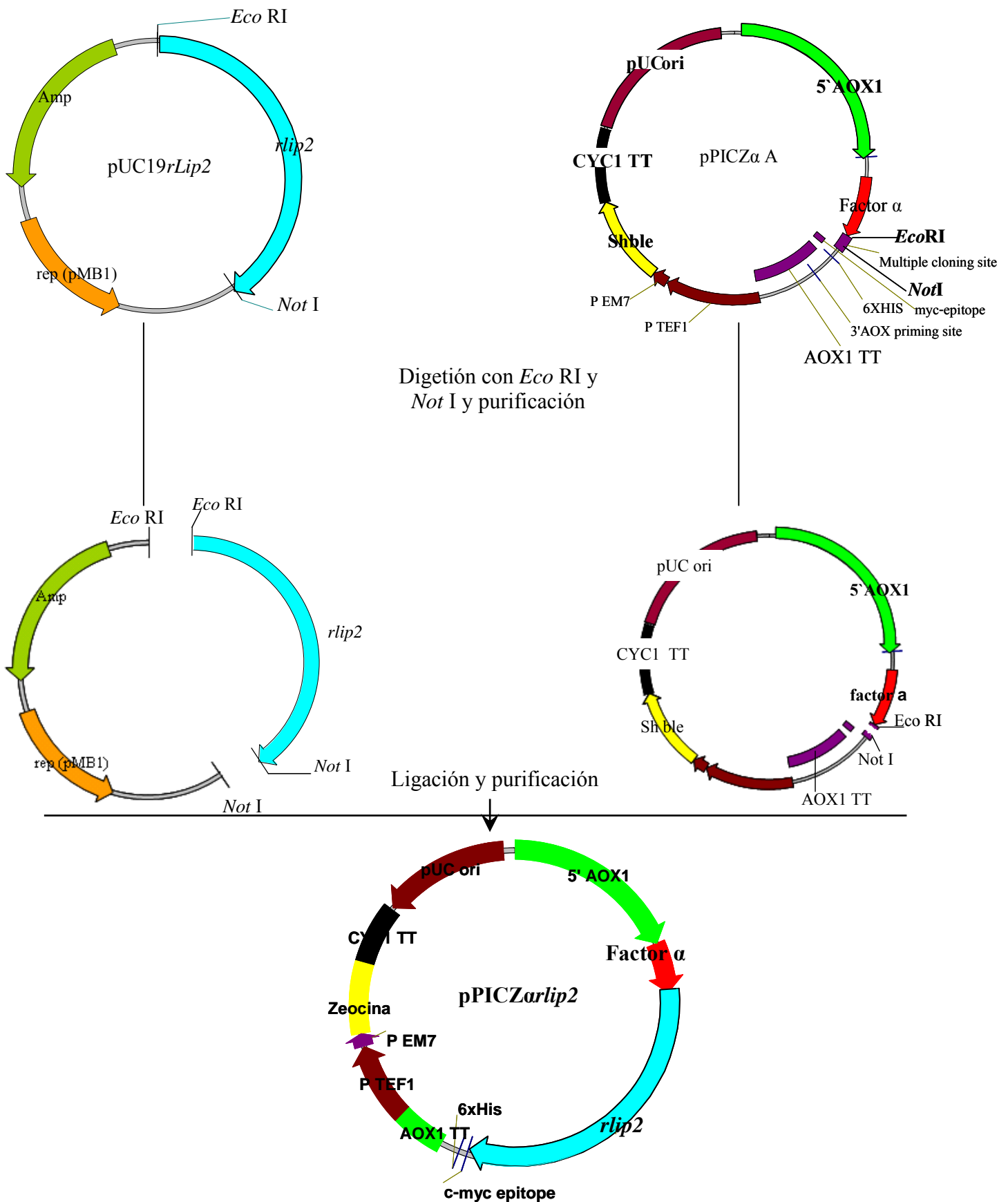


Fig. 5.3.- Esquema de formación del plásmido pPICZarlip2, purificando del gen *rlip2* desde el plásmido pUC19rlip2, los detalles de ambos plásmidos se especifican en materiales y métodos.

5.1.3- Transformación de *Pichia pastoris*

Posterior a la clonación del plásmido pPICZ α lip2 (Fig. 5.3, 5.4 y 5.5) en *E. coli* DH5 α y su purificación, se procedió a su linealización con la enzima de restricción *Sal* I. El plásmido digerido se utilizó para transformar *P. pastoris* X33 mediante electroporación, integrándose al locus *aox1* de su genoma, lo que nos permitió la obtención exitosa de 12 clones de *P. pastoris* en placas de agar YPD-zeocina. A continuación, estos clones se cultivaron en Erlenmeyers en medio definido y metanol como fuente de carbono (medio BMM) según el protocolo descrito en materiales y métodos. Todos ellos secretaban la proteína recombinante Lip2 activa. En la tabla 5.1 se resumen los valores de biomasa y actividad lipásica alcanzados para cada cultivo después de 48 horas. Se puede observar que los niveles de actividad específica son variables según los clones. Esto ha sido atribuido a la llamada variación clonal (distintos niveles de expresión entre distintos transformantes con idéntico vector de expresión). No obstante, parte de la variabilidad también puede ser atribuida a la poca reproducibilidad de los cultivos en Erlenmeyers (no se realizaron réplicas de los cultivos dado el número de clones a analizar). De estos 12 clones, 4 fueron pre-seleccionados por presentar una actividad lipásica específica igual o superior a uno (clones 7, 8, 9 y 12) (Tabla 5.1). Estos 4 clones se sometieron a un proceso de resiembra en placas de YPD-zeocina para garantizar su pureza y se generaron stocks a -80° C. Asimismo, se seleccionó el clon número 12 (Tabla 5.1, Fig. 5.6) por presentar la mayor actividad lipásica específica como cepa productora de Lip2 recombinante para los estudios subsiguientes de producción y caracterización.

Tabla 5.1.- Selecciones de clones de *P. pastoris* productores de actividad lipasa

Clon N°	Absorbancia D.O. 600	Act. Lipasa (U/mL)	Act. específica (U/mL)/DO ₆₀₀
1	12,53	4,88	0,39
2	10,92	3,91	0,36
3	11,5	6,25	0,54
4	8,83	3,71	0,42
5	9,23	1,75	0,19
6	8,93	0,99	0,11
7	9,23	15,65	1,70
8	12,71	12,72	1,00
9	9,34	4,69	0,50
10	11,55	9,68	0,84
11	8,77	11,74	1,34
12	8,21	20,06	2,44

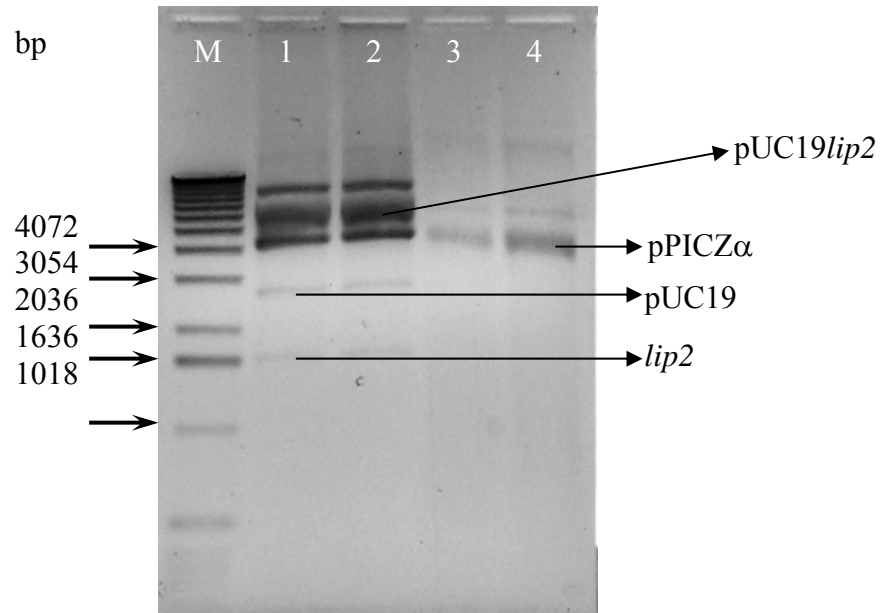


Fig. 5.4.- Gel de agarosa, M es el marcador de peso molecular en pares de bases (bp). Los carriles 1 y 2 corresponden al plásmido pUC19, digerido parcialmente con *Eco* RI y *Not* I, y los carriles 3 y 4 al plásmido pPICZ α .

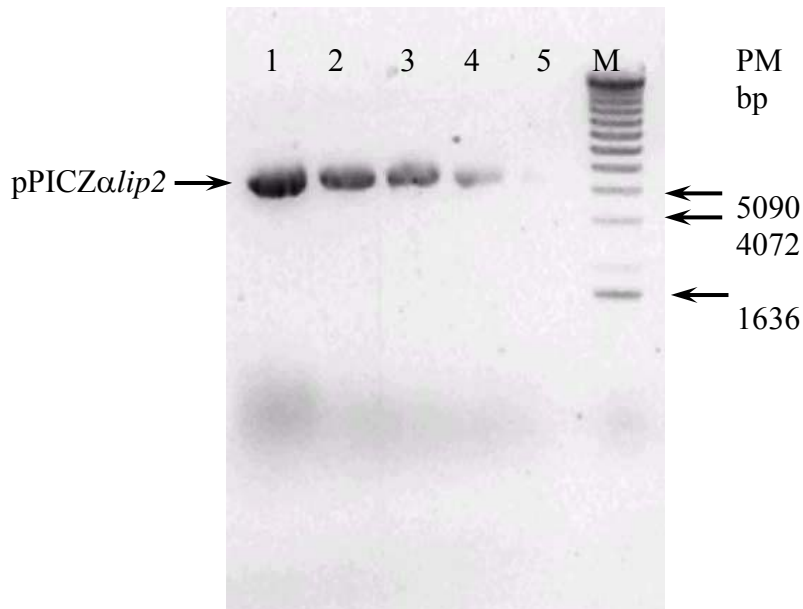


Fig.5.5.- Gel de agarosa, donde se aprecia el resultado de la ligación. M es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb). Los carriles 1-5 son muestras de pPICZ α lip2 en dilución seriada, a partir de la obtención del plásmido mediante midi-prep; M Marcador de peso molecular.

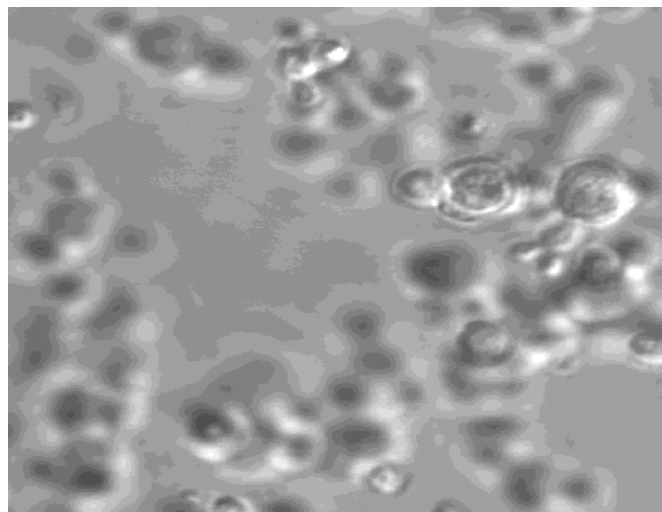


Fig. 5.6.- Fotografía de *Pichia pastoris* X33/pPICZarlip2, clon número 12 seleccionado para fermentaciones de producción de la enzima recombinante lipasa 2 (rLip2), 100X.

5.2- Producción de rLip2 en *P. pastoris*

Seleccionado el clon (clon 12) para la expresión de la proteína recombinante Lip2, dada su mayor actividad lipásica específica en cultivos en Erlenmeyers, se procedió a realizar el escalado a fermentadores de 5 litros en operación en discontinuo. De esta manera se podría trabajar en un sistema con monitorización y control de los parámetros ambientales de la fermentación como son el pH y el oxígeno disuelto y por consiguiente poder obtener una mayor producción de biomasa y de proteína heteróloga en condiciones más controlables y reproducibles. Las fermentaciones en discontinuo se realizaron en medio BMM con metanol como fuente de carbono, para así inducir la producción de rLip2.

Una primera fermentación preliminar se realizó a pH constante de 5,5 y una concentración de oxígeno disuelto superior al 20% actuando el control sobre el caudal de aireación; estos parámetros se escogieron para trabajar lejos del pH óptimo de las proteasas de *P. pastoris* que es alrededor de pH 7,0 y poder mantener el cultivo en condiciones aeróbicas, condiciones óptimas de trabajo recomendadas por Invitrogen para la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. Se partió de una concentración inicial de metanol del orden de 10 g/L, concentración que fue consumida prácticamente en su totalidad en las primeras 20 horas de fermentación detectándose una actividad lipásica que alcanzó el valor de 12 U/mL, al término de la fermentación.

Estos resultados fueron esperanzadores ya que los valores de actividad obtenidos eran del mismo orden de magnitud a los obtenidos con la cepa nativa de *C. rugosa* en cultivos en discontinuo utilizando ácido oleico como sustrato. Concretamente se obtuvieron 12,1 U/mL utilizando como sustrato 12 g/L de ácido oleico (Gordillo *et al.*, 1995). Por consiguiente, además de obtener unos valores de actividad similares se estaba obteniendo la isoenzima lip2 pura, y no una mezcla de isoenzimas como las obtenidas con el cultivo de la levadura nativa *C. rugosa*.

5.2.1.- Fermentaciones de *P. pastoris* a distintos pHs.

Una vez observados los prometedores resultados en discontinuo a pH 5,5; se procedió a estudiar de manera sistemática el efecto de pH en la producción de la proteína heteróloga con el objetivo de determinar el pH óptimo de producción para las futuras fermentaciones a realizar en discontinuo alimentado. Si bien el pH previo escogido fue de 5,5 por ser el habitual de trabajo de *P. pastoris*, se evaluaron las prestaciones a pH 6,5 y 7,5 con objeto de alejarse del punto isoeléctrico de la Lip2, muy cercano a 5,5, y para observar si el pH tiene efecto tanto sobre los niveles de lipasa producidos, como sobre el momento de su detección en el medio de cultivo.

Se repitió una nueva fermentación a pH 5,5 y se obtuvo una máxima actividad lipásica de 19,0 U/mL a las 40 horas de fermentación, consumiendo en el transcurso de las primeras 20 horas los aproximadamente 10 g/L de metanol utilizados como fuente de carbono, la densidad óptica del cultivo se mantuvo constante a partir de las 23 horas de fermentación siendo la densidad óptica máxima de 15,1 unidades de absorbancia equivalentes a 3,2 g/L de biomasa de cultivo (Fig. 5.7).

La producción de la rLip2 se encontraba ligeramente desacoplada con el crecimiento del microorganismo, se producía un cierto retraso con respecto al crecimiento del mismo, alcanzándose el máximo de actividad en la fase estacionaria de crecimiento, lo que puede indicar limitaciones en el proceso de síntesis de la proteína o de secreción de la misma al medio de cultivo bajo este pH de trabajo.

Cuando se realizó la fermentación en discontinuo a pH 6,5 se obtuvo una máxima actividad lipásica de 31,8 U/mL a las 23 horas de fermentación, no detectándose una bajada de la misma hasta las 55 horas, seguramente por acción de las proteasas (Fig. 5.8). Se debe destacar que en la presente fermentación se detectó la presencia de actividad lipásica (11,3 U/mL) a partir de las 13 horas de fermentación, cuando todavía existe la presencia de una concentración de metanol de 4,3 g/L en el medio, lo que

indica que, en este caso, la producción no se encuentra tan desacoplada con el crecimiento como en la fermentación a pH 5.5.

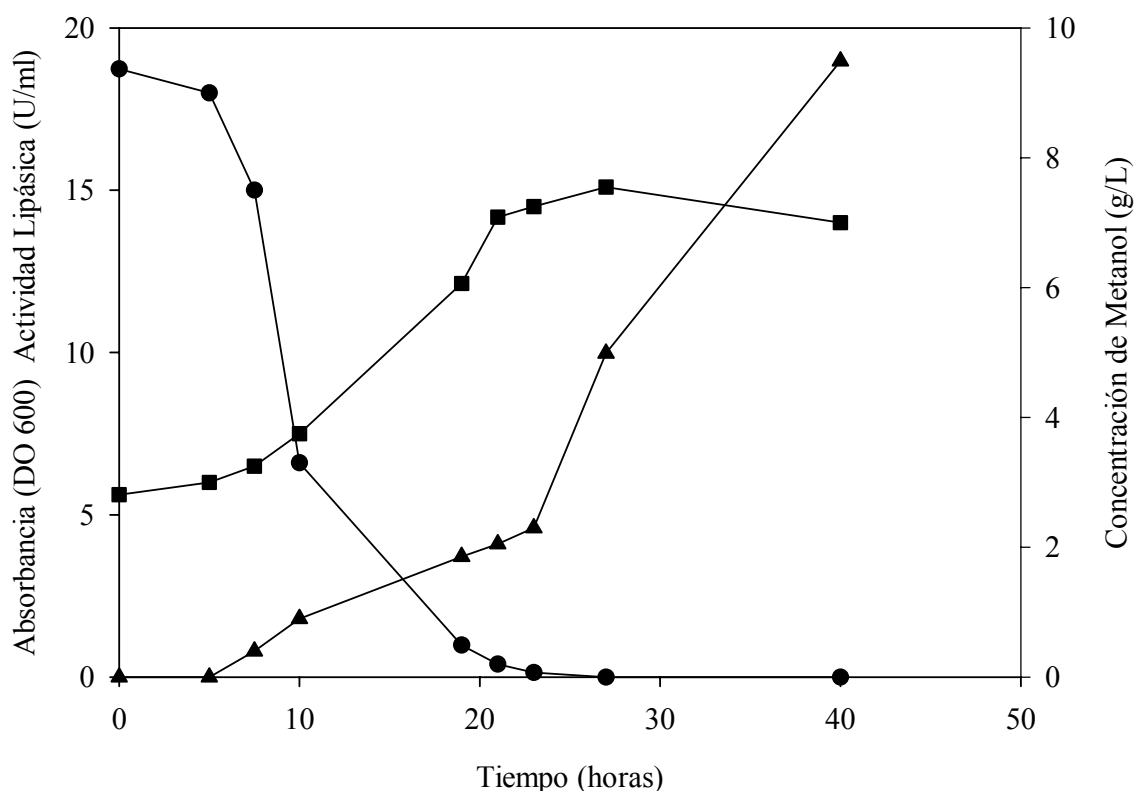


Fig. 5.7.- Fermentación de *P. pastoris* para la expresión de *rlip2* en discontinuo a pH 5,5. ■ biomasa, medida mediante la densidad óptica a 600 nm, ▲ actividad lipásica (U/mL), ● concentración de metanol en g/L.

El consumo de los aproximadamente 10 g/L de metanol se produjo en el transcurso de las primeras 20 horas, la densidad óptica del cultivo se mantuvo estable a partir de las 17 horas de fermentación siendo la densidad óptica máxima de 19 unidades de absorbancia, equivalente a 4 g/L de biomasa. Al final de la fermentación se aprecia una disminución en la densidad óptica, lo que indicaría el inicio de la fase de muerte celular para el presente cultivo (Fig. 5.8).

A diferencia de la fermentación anterior a pH 5,5 los niveles de actividad lipásica obtenidos en la fermentación a pH 6,5 son prácticamente el doble.

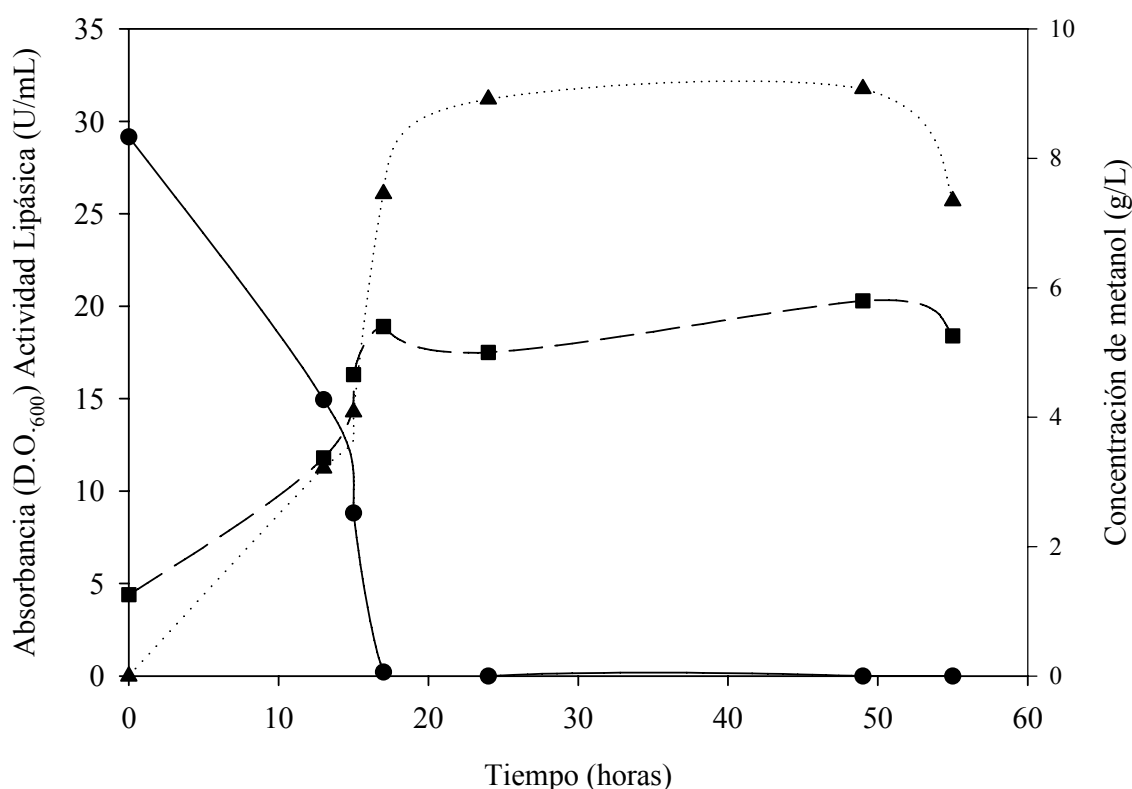


Fig. 5.8.- Fermentación de *P. pastoris* para la expresión de *rlip2* en discontinuo a pH 6,5. ■ biomasa medida mediante densidad óptica a 600 nm. ▲ Actividad lipásica (U/mL). ● Concentración de metanol en g/L.

La fermentación a pH 7,5 presentó problemas principalmente operacionales. A este pH se produce una precipitación importante de componentes del medio de cultivo.

Este hecho ya desaconseja trabajar bajo estas condiciones. No obstante se realizó la fermentación obteniéndose una máxima actividad lipásica de 13 U/mL a las 23 horas de fermentación, con una concentración de metanol de 3,93 g/L todavía presente en el medio. A partir de este punto se observó una disminución de la actividad lipásica probablemente debido a la acción de las proteasas, ya que el pH 7,5 es el óptimo de actividad de las enzimas proteolíticas de *Pichia*. Por estos motivos señalados se descartó el pH 7,5 como posibles pH de trabajo.

En la tabla 5.2 se presentan los valores de actividades lipásicas máximas, rendimientos y productividades obtenidos en las dos fermentaciones de *Pichia* a pHs de 5,5 y 6,5 comparándose con los obtenidos en una fermentación con la levadura *Candida rugosa* creciendo sobre 8 g/L de ácido oleico (Gordillo, 1995).

Como se observa en la tabla 5.2 los valores máximos de todos los parámetros se alcanzaron a pH 6,5 utilizando el microorganismo huésped. Además de obtenerse en este experimento la máxima productividad, también se consiguió el mayor rendimiento de producto por gramo de substrato consumido y gramo de biomasa generada. Un gel de electroforesis SDS-PAGE reveló una banda a 62 kDa que corresponde al peso molecular esperado de la rLip2.

Por estos motivos se procedió a seleccionar el pH 6,5 (Fig. 5.8) para realizar las sucesivas fermentaciones en discontinuo alimentado, ya que a este pH se alcanzó la mayor actividad lipásica, y el mayor crecimiento del microorganismo sin problemas operacionales. Además, este pH se encuentra alejado del punto isoeléctrico (teórico) de las lipasas de *C. rugosa*, situado en 4,9 y además todavía se encuentra relativamente alejado del pH óptimo de actividad de las proteasas de *P. pastoris*.

Estos resultados confirman al sistema *P. pastoris* como una alternativa prometedora para la obtención de rLip2. Desde el punto de vista de producción, se ha obtenido una actividad lipásica 2.6 veces mayor a la obtenida con el microorganismo nativo. Además desde el punto de vista económico el proceso de purificación será mucho más simple puesto que *Pichia* secreta pocas proteínas extracelulares y la proteína recombinante que se obtiene en este caso es la isoenzima pura rLip2.

Tabla 5.2. Comparación entre las prestaciones de la lipasa producida en el microorganismo nativo *C. rugosa* y en el microorganismo huésped *P. pastoris*

Fermentación	Actividad lipásica máxima (U/mL)	$Y_{P/S}$ (U/mg S)	$Y_{P/X}$ (U/mg)	Productividad (U/ L h)
<i>Pichia</i> pH 5,5	19.0	2.02	5.9	452
<i>Pichia</i> pH 6,5	31.8	3.8	8.0	795
<i>Candida rugosa</i>	12.1	1.5	1.8	302

5.2.2.- Fermentaciones de *Pichia pastoris* siguiendo una estrategia de operación discontinuo alimentado.

Realizada la selección clonal en matraces Erlenmeyers y la optimización del pH de cultivo en fermentaciones en discontinuo, se procedió a realizar fermentaciones con medio definido (Invitrogen) en discontinuo alimentado para obtener una elevada densidad celular con el objetivo de conseguir unos elevados niveles de proteína recombinante. Así, se realizaron diversas fermentaciones compuestas por 3 etapas cada una. La primera es la fase en discontinuo, dirigida a la obtención rápida de biomasa; en esta etapa, la fermentación se alimentó con glicerol (20 g/L) como única fuente de carbono. La segunda fase es la etapa de transición que comienza una vez consumido completamente el glicerol adicionado inicialmente, detectado mediante el aumento súbito del oxígeno disuelto. En esta etapa se produce un cambio de la alimentación de forma gradual, de una alimentación exclusiva con glicerol a la alimentación exclusiva con metanol. Finalmente, la tercera fase es la etapa de inducción en la que se alimenta al microorganismo exclusivamente con metanol manteniendo la concentración constante en el medio de cultivo en 3 g/L. Esta concentración de metanol ha sido seleccionada para trabajar en la zona de máxima velocidad de crecimiento. Para ello se realiza una adición de metanol de caudal variable por la acción de un controlador PI previamente desarrollado en el grupo a partir de la medida en línea de metanol (Cos *et al.*, 2006).

De las diversas fermentaciones realizadas, se presentan las denominadas fermentaciones 1, 2 y 3.

La fermentación 1 (Fig. 5.9) se llevó a cabo durante 42 horas, periodo en el cual no se detectó la presencia de actividad lipásica. Los aproximadamente 20 g/L de glicerol adicionados fueron consumidos durante las primeras 25 horas, periodo que corresponde a la fase en discontinuo (fase I). Posterior al periodo de transición (5 h) (fase II), en que se mantiene la fermentación con una alimentación mixta (glicerol/metanol), se procedió a la alimentación exclusiva con metanol (fase III). Como se puede observar el sistema de control no fue capaz de mantener la consigna a 3 g/L. Se produjo una acumulación máxima de 2,6 g/L a las 42 horas de fermentación. Esto se debió a que el controlador PI, que estaba en fase de validación, no se encontraba bien sintonizado.

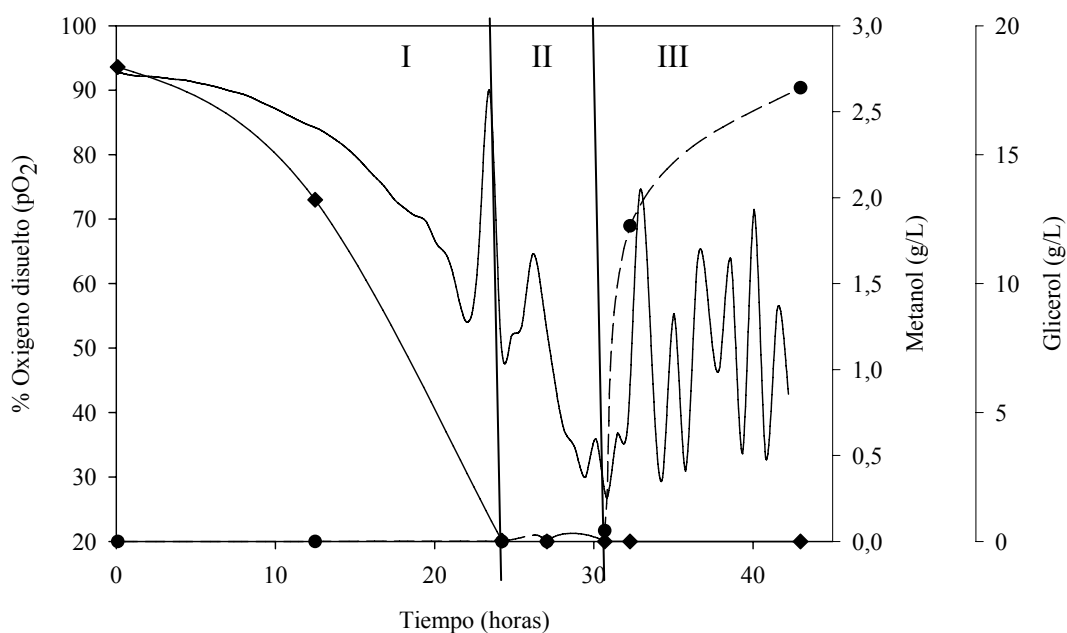


Fig. 5.9.- Análisis de glicerol y metanol en función del tiempo para la fermentación 1. ♦ Concentración de glicerol, • concentración de metanol, — pO₂. Zona I, periodo discontinuo de la fermentación; zona II, periodo de transición y zona III, discontinuo alimentado (inducción).

A las 42 horas la fermentación 1 alcanzó una biomasa final de 25 g/L y el máximo nivel de proteína extracelular, 130 µg/mL (Fig. 5.10).

El oxígeno disuelto, actuando sobre el caudal de adición de aire y manteniendo la agitación constante a 800 rpm, presentaba oscilaciones con valores superiores al 25% (Fig. 5.9). El caudal de aireación se mantuvo estable hasta las 30 horas con un valor del 1,5 L/min, a partir de este instante se generan oscilaciones de caudal de aireación, con periodos discontinuos que en su mayor amplitud llegan hasta los 20 L/min, que corresponde a la capacidad máxima de aireación que puede proporcionar el equipo de fermentación.

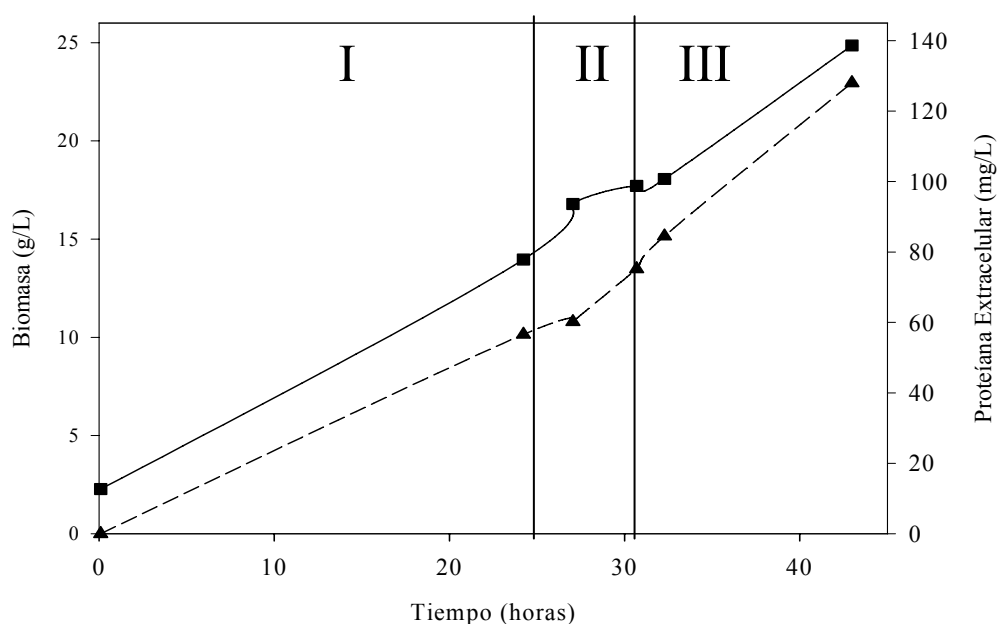


Fig. 5.10.- Análisis de proteína extracelular y biomasa en función del tiempo para la fermentación 1. ■ biomasa medida como peso seco. ▲ proteína extracelular. La zona I, corresponde al periodo del discontinuo de la fermentación; la zona II, corresponde al periodo de transición y la zona III, corresponde al discontinuo alimentado (inducción).

El crecimiento del microorganismo y el consumo de los substratos a lo largo de la fermentación se han comportado de acuerdo a lo observado en otras fermentaciones realizadas dentro del grupo de investigación para la obtención de la lipasa heteróloga del hongo *Rhizopus oryzae*. Sin embargo, el hecho más significativo es la no presencia de actividad lipásica en el medio de cultivo.

Con el objetivo de determinar si se produce la enzima recombinante rLip2, ya que no se observa actividad lipásica, se realizó un gel SDS-PAGE de seguimiento de la fermentación 1. En la figura 5.11 se puede apreciar mayoritariamente una tenue banda alrededor de 120 kDa, que correspondería al peso molecular teórico del dímero de la rLip2 y cuyo aumento de intensidad a lo largo de la fermentación se correlaciona con el aumento en la producción de la proteína extracelular en el medio de cultivo (Fig. 5.10). A destacar que no se observa presencia del monómero de rLip2, a diferencia de los experimentos en discontinuo donde se observaba actividad lipásica, lo que parece indicar que la actividad enzimática está ligada a la forma monomérica.

Por consiguiente, el cambio de medio de cultivo y/o modo de operación provoca la formación de agregados del producto recombinante.

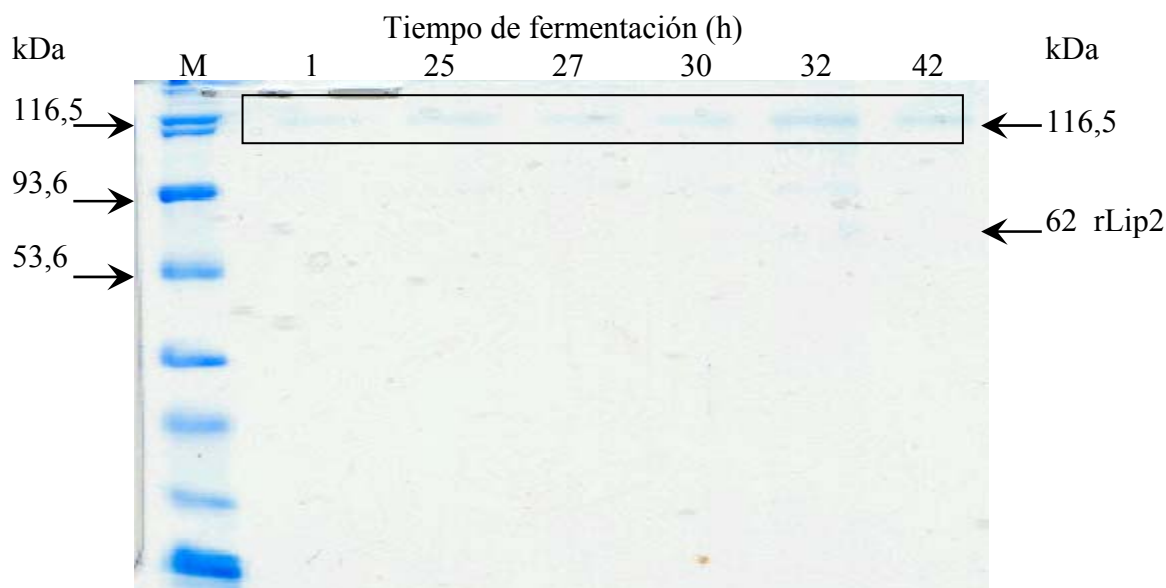


Fig. 5.11.- Gel SDS-PAGE al 12 % acrilamida revelado con solución de Coomassie, donde se aprecia las proteínas extracelulares para diferentes tiempos (fermentación 1). M.- Marcador de peso molecular. Se indica la posición en donde debiera encontrarse rLip2 con un PM de 62 KDa, y enmarcado en un rectángulo donde se encuentra el posible dímero de rLip2 con un PM de 116,5 KDa.

Con objeto de controlar de manera precisa la concentración de metanol a 3 g/L se realizó una segunda fermentación, trabajando con el controlador PI optimizado. Como se observa en la figura 5.12 el control de metanol en este caso fue satisfactorio. Por otra parte, se mantuvo constante el caudal de aireación a 15 L/min, con objeto de mantener siempre unos niveles de oxígeno disuelto superiores al 20% y así evitar las oscilaciones observadas con este parámetro en el anterior experimento.

La fermentación 2 se mantuvo durante 48 horas, momento en que se alcanza el mismo nivel de biomasa que la fermentación 1. El glicerol añadido se consumió durante las primeras 23 horas en que se llevó a cabo la fase discontinua. A continuación, se realizó la etapa de transición que duró 5 horas. Posteriormente comenzó la etapa de inducción a una consigna de 3 g/L de metanol hasta finalizar la fermentación. Se alcanzó una concentración de biomasa (23,8 g/L) y un máximo de proteína extracelular de 720 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 5.13). En comparación con la fermentación 1, con aproximadamente la misma concentración de biomasa, se obtiene un nivel de proteína extracelular 5 veces mayor. A medida que aumenta la concentración de biomasa en la etapa de inducción, utilizando como única fuente de carbono metanol, disminuye el oxígeno disuelto alcanzando un valor del 20% al final de la misma. Este hecho confirma las altas

necesidades de oxígeno por parte del fenotipo Mut⁺ lo que puede conllevar problemas operacionales de suministro del mismo.

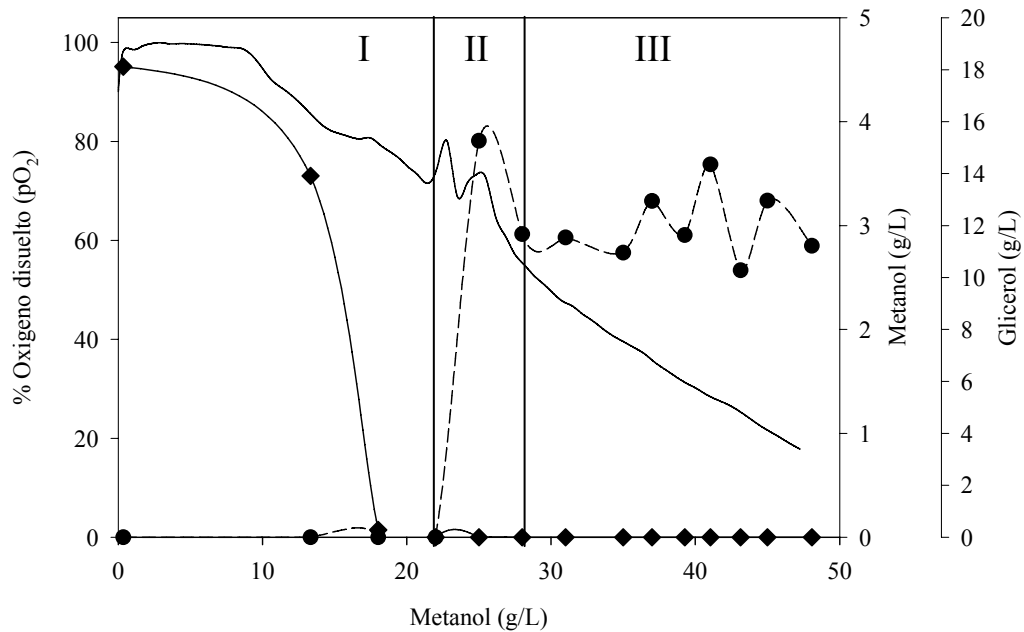


Fig. 5.12.- Análisis de oxígeno disuelto (pO_2), metanol y glicerol en función del tiempo para la fermentación 2. ♦ Concentración de glicerol, ● concentración de metanol y — % pO_2 .

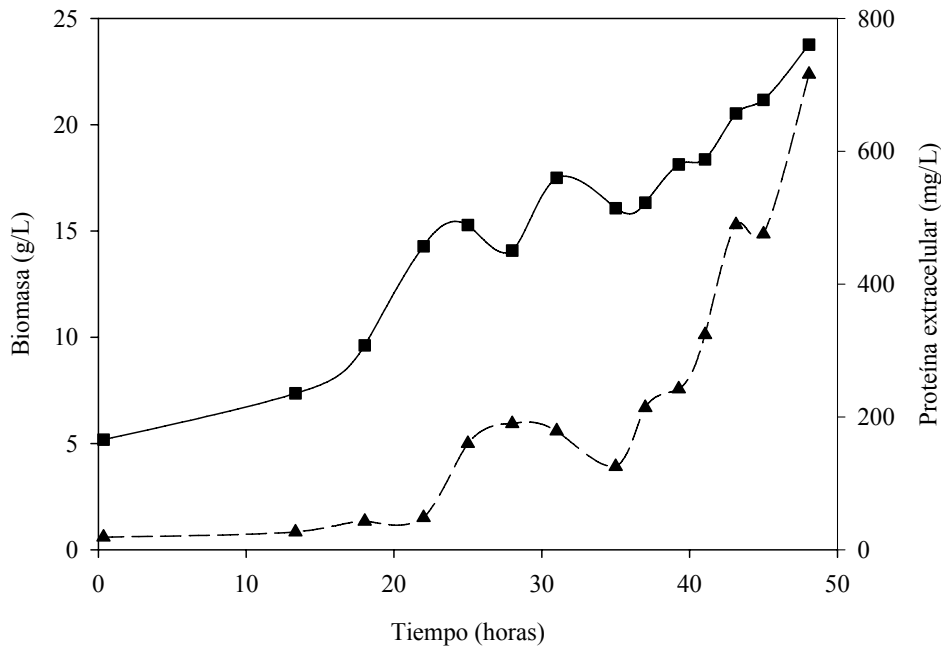


Fig. 5.13.- Análisis de proteína extracelular y biomasa en función del tiempo para la fermentación 2. ■ biomasa medida como peso seco. ▲ proteína extracelular.

Nuevamente no se detectó actividad lipásica a lo largo de la fermentación, siendo el gel de electroforesis de la fermentación 2 muy similar al observado en la figura 5.11 para la fermentación 1. Con el fin de comprobar la presencia de rLip2 en la fermentación 2 se realizó el correspondiente análisis de detección inmunológico (western-blot) en el que se reconoció la forma dimérica de la proteína (Fig. 5.14). A destacar que se detecta la presencia de la proteína solo en forma dimérica desde el inicio de la fase de transición.

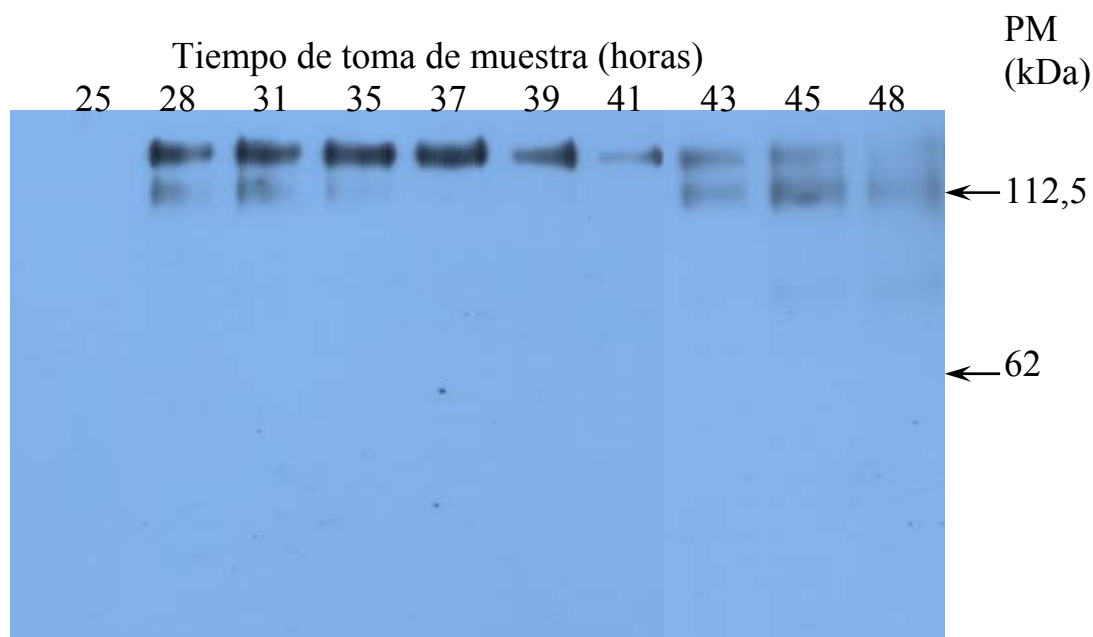


Fig. 5.14.- Western-Blot de la fermentación 2. Los números en los carriles indican los tiempos de toma de muestra, los 62 KDa indican la zona de rLip2 monomérica.

Con el controlador PI para metanol funcionando correctamente se procedió a realizar una tercera fermentación (fermentación 3). A diferencia de las anteriores se inició con una concentración de glicerol del orden de 40 g/L para disponer de una mayor concentración de biomasa inicial en la etapa de inducción. La fermentación 3 fue seguida hasta las 53 horas. En este punto se da por finalizada la fermentación porque trabajando a 800 rpm y el caudal de aire máximo que puede proporcionar el equipo no se conseguía mantener el pO_2 por encima del 10% debido a los altos consumos de O_2 que necesita el fenotipo Mut^+ de *P. pastoris* (Fig. 5.15).

El glicerol añadido (36 g/L) se consumió durante las primeras 19 horas en que se llevó a cabo el discontinuo. En la etapa de inducción se fijó una consigna de 3 g/L de metanol, similar a la de la fermentación 2. Como era de esperar la concentración de biomasa final alcanzada fue mayor que en la fermentación 2 llegando a un valor de 43,6 g/L (Fig. 5.16). Sin embargo, sorprendentemente, el nivel máximo de proteína extracelular

detectada fue similar con un valor de $710 \mu\text{g/mL}$. Nuevamente no se detectó actividad lipásica a lo largo de la fermentación.

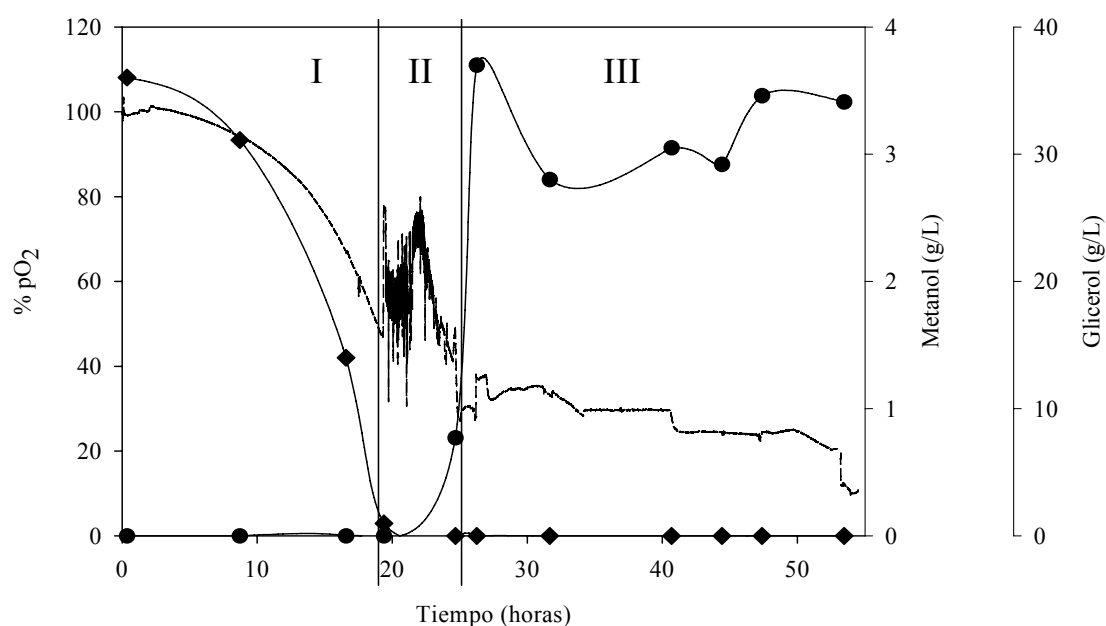


Fig. 5.15.- Análisis de oxígeno disuelto (pO_2), metanol y glicerol en función del tiempo para la fermentación 3. ♦ Concentración de glicerol, ● concentración de metanol y - - - - - % pO_2 . La zona I, corresponde al periodo del discontinuo de la fermentación; la zona II, corresponde al periodo de transición y la zona III, corresponde al semicontinuo (inducción).

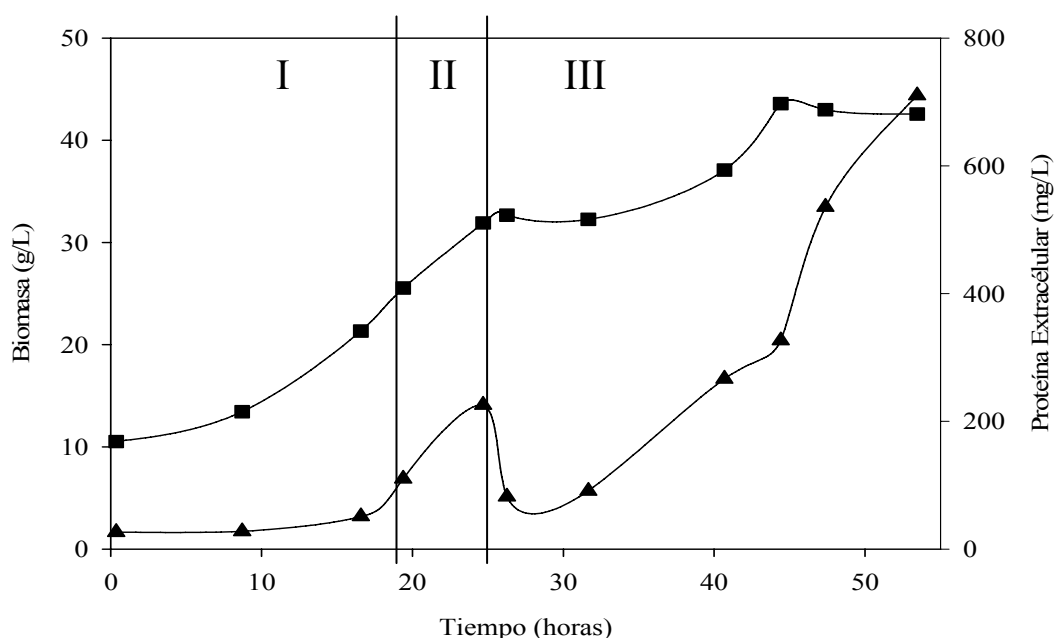


Fig. 5.16.- Análisis de proteína extracelular y biomasa en función del tiempo para la fermentación 3. ■ biomasa medida como peso seco. ▲ proteína extracelular. La zona I, corresponde al periodo del discontinuo de la fermentación; la zona II, corresponde al periodo de transición y la zona III, corresponde al semicontinuo (inducción).

5.3.- Recuperación de la actividad lipásica rLip2.

Una vez detectado el problema de la formación del dímero de rLip2 sin actividad lipásica, se procedió a la recuperación de la rLip2 del caldo de cultivo para un posterior tratamiento que permita la recuperación del monómero y por consiguiente de su actividad. Previamente, para intentar obtener la separación del dímero en geles de electroforesis, se aplicaron técnicas de desnaturalización consistentes en duplicar el tampón de carga para conseguir una mayor desnaturalización química y en aumentar los tiempos de desnaturalización a 100°C con objeto de incrementar la desnaturalización térmica. En la figura 5.17 se presenta el western-blot resultante de esta estrategia, donde se observa que si bien se consigue una mejor desagregación del dímero, éste no se resuelve en su totalidad. Esto indica que la forma dimérica presenta una gran estabilidad en el medio de cultivo utilizado.

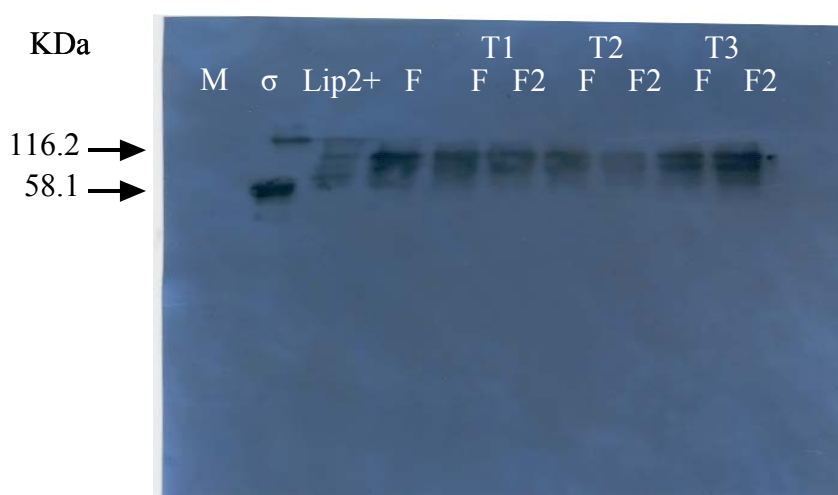


Fig. 5.17.- Western-Blot para el ensayo de desnaturalización. F= Fermentación1; F2= Fermentación1 con doble concentración de tampón de carga; T1= 5 min, T2= 10 min y T3= 15 min, tiempos de desnaturalización a 100° C. σ lipasa comercial sigma, Lip2+: solución diafiltrado rLip2 positiva

La literatura indica extensamente la agregación de un gran número de lipasas, formando dímeros e inclusive tetrámeros, lo que ha interferido en diversas ocasiones en la determinación del peso molecular. Las distintas conformaciones de las proteínas pueden inducir una disminución de actividad de la enzima, lo que se ha observado para las lipasas de *Bacillus thermocatenuatus* (Rúa *et al.*, 1997), *Burkholderia cepacia* (Dünhaupt *et al.*, 1992), *Bacillus subtilis* (Lesuisse *et al.*, 1993) o las lipasas de *Pseudomonas sp* (Graupner *et al.*, 1999). Estas diversas conformaciones se han

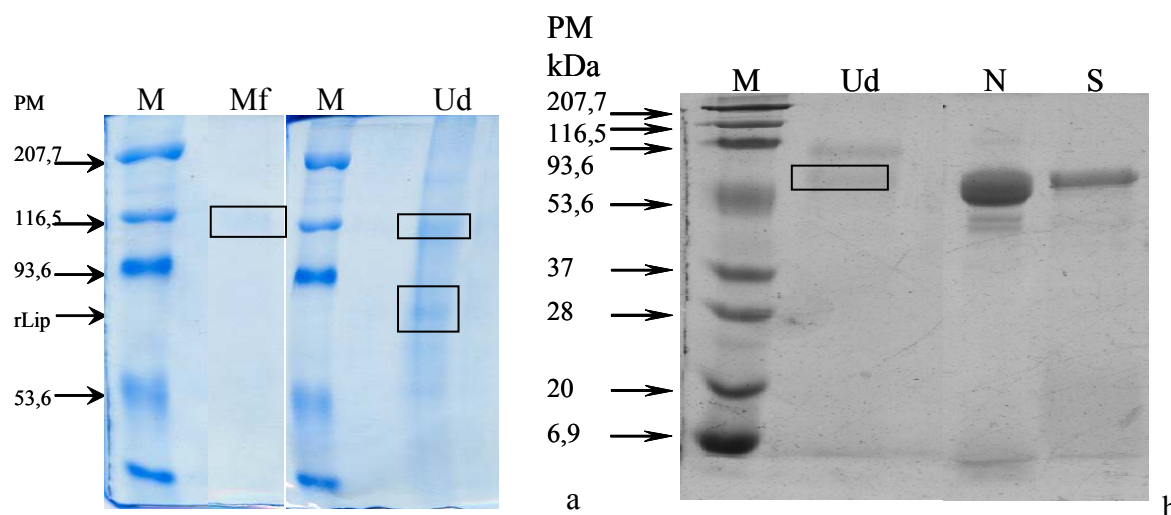
demostrado que están inducidas por la presencia de compuestos no proteicos, como carbohidratos o lípidos (Pernas, 2003), sin embargo, esta agregación no tiene porque ser mediada por la presencia de estos compuestos, de hecho, se ha detectado que la lipasa de *Penicillium simplicissimum* se encuentra en medio acuoso como monómero, dímero, trímero y tetramero (Sztajer *et al.*, 1992). Las lipasas poseen una zona particularmente hidrofóbica que incluye la cara interna de la tapadera y la región en torno al centro activo, de tal manera que en presencia de una interfase hidrofóbica, la forma abierta de la lipasa se adsorbe a ésta mediante interacciones con esta región. A pesar de que normalmente es el sustrato el que proporciona la interfase, también la puede proporcionar otra lipasa que se encuentre en su conformación abierta, explicando de esta manera la aparición de formas agregadas. Así pues, la alta concentración de lipasa y también una alta salinidad en el medio de reacción favorece la formación de dímeros (Pernas, 2003).

El dímero rLip2 producido no presenta actividad lipásica ni con sustratos sintéticos (test de actividad), ni con sustratos naturales como el aceite de oliva en reacciones de hidrólisis. Sin embargo otros dímeros como el de Lip3 si que mantiene su actividad (Sanchez *et al.*, 1999). Una posible hipótesis es que la formación del dímero mantiene unas interacciones tan fuertes entre sus monómeros que no permite la accesibilidad de los sustratos al centro activo.

Efectivamente en la producción de rLip2 se dan las condiciones de alta concentración de proteína recombinante y de alta fuerza iónica que favorecen la agregación, por lo que se planteó disminuir la salinidad del medio y comprobar que esta fuera la causa de la formación del dímero.

Para la recuperación de la rLip2 del caldo de cultivo se aplicó una estrategia clásica consistente en la separación por centrifugación de la biomasa del sobrenadante de la fermentación, microfiltración para separar el remanente de biomasa, ultrafiltración tangencial para eliminar las proteínas de bajo peso molecular y concentrar la proteína de interés, y dos etapas de diafiltración posteriores a la ultrafiltración utilizando una solución Tris-HCl pH 7.5 10 mM (Materiales y métodos). Una vez realizada esta etapa, se observó la presencia de actividad lipásica en el diafiltrado y si bien los geles de electroforesis revelan la presencia de dímero se observa también la presencia del monómero, cuyo peso molecular se corresponde al esperado teóricamente de 62 kDa (Fig. 5.18a). En la figura 5.18b se compara con las lipasas nativas tanto comerciales como producidas por nuestro grupo de investigación, no observándose en estas últimas

la presencia del dímero. Se demuestra que la alta salinidad del medio es una de las causas de la formación del dímero, y que mediante la diafiltración se puede revertir parcialmente el proceso.



5.18.- Gel SDS-PAGE al 12 % acrilamida revelado con solución de Coomassie,

5.18a Se aprecia las proteínas extracelulares para la fermentación 2. M.- Marcador de peso molecular, Mf muestra final, Ud dia-ultrafiltrado. **5.18b** M marcador de peso molecular, Ud dia-ultrafiltrado, las proteínas nativas de *C. rugosa*, N producidas en la UAB, S de la casa comercial sigma. Se indica con un rectángulo la posición en donde debiera encontrarse rLip2 con un PM de 62 kDa y/o del dímero de rLip2.

El proceso descrito de recuperación se realizó para las fermentaciones 1, 2 y 3, y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5.3. Los microfiltrados de las fermentaciones 1 y 2 se sometieron a un proceso de ultra y diafiltración de forma conjunta y los de la fermentación 3 por separado. Se aprecia que la pérdida de proteína en el proceso de microfiltración no es muy elevada (entre el 5 y el 20%). Para las fermentaciones 1 y 2, después de la diafiltración el porcentaje de proteína total recuperado disminuye hasta el 50% debido a la eliminación de las proteínas de peso molecular inferior a 10 KDa. Es muy interesante destacar que el diafiltrado presenta 2500 U/ml de actividad en 800 mL de volumen final. En el caso de la fermentación 3 el valor es mayor, para un volumen final de diafiltrado de 1200 mL, se llega a alcanzar una actividad de 4052 U/mL. Esto supone una actividad total al final del proceso de prácticamente 5 millones de unidades, a pesar de continuar detectándose presencia del dímero.

Tabla 5.3.- Evaluación del proceso de recuperación lip2

Fermentaciones	Concentración de Proteína (mg/L)	Proteína total (mg)	Rendimiento en proteína (%)	Actividad Lipásica (U/mL)	Actividad lipásica total (Miles U)
Centrifugado fermentación 1	125	325	100		
Microfiltrado fermentación 1	100.3	260.8	80,2		
Centrifugado fermentación 2	713	1996.4	100		
Filtrado fermentación 2	685.2	1918.6	96,1		
Diafiltrado fermentación 1+2	796.8	629.5	---	2500	2000
Centrifugado fermentación 3	700	2345	100		
Microfiltrado fermentación 3	686	2298	98		
Diafiltrado fermentación 3	1297	1556	66	4052	4862

Centrifugado= centrifugado al termino de fermentación, para la separación de biomasa
 Filtrado=filtrado con un filtro de 0,45 μm de diámetro de por para separar biomasa remanente. Díafiltrado= una ultrafiltración de 10 KDa y dos diálisis.

Los niveles de actividad obtenidos en un sistema de recuperación similar con la levadura nativa *C. rugosa*, utilizando como fuente de carbono ácido oleico, en una operación en discontinuo alimentado en un volumen de biorreactor de 5 litros, alcanzaron las 5010 U/mL en un volumen final de 100 mL, lo que representa un total de 501 miles de unidades de actividad (Sánchez, 1998). Así pues, la producción en *P. pastoris* fue 10 veces mayor que en *C. rugosa*, valor que podría ser incluso superior si todo el dímero producido se hubiera podido recuperar como monómero activo.

Se puede afirmar que la producción de la rLip2 es función de la concentración de biomasa que se obtiene, ya que para la fermentación 3, el hecho de iniciar la fase de inducción con una concentración de biomasa mayor ha permitido niveles de actividad lipásica superiores.

Para intentar cuantificar la rLip2 activa, asociada al monómero, se utilizó un sistema de filtración en columna para desalinizar muestras (HiTrap™ Desalting Column, Amersham). Se trabajó con las muestras provenientes de la fermentación 3 previamente centrifugadas. Se puede observar la presencia del monómero conjuntamente con posibles agregados figura 5.19. El hecho que una columna desalinizadora permita la obtención de monómeros reafirma que la alta salinidad del medio provoca la agregación de los mismos.

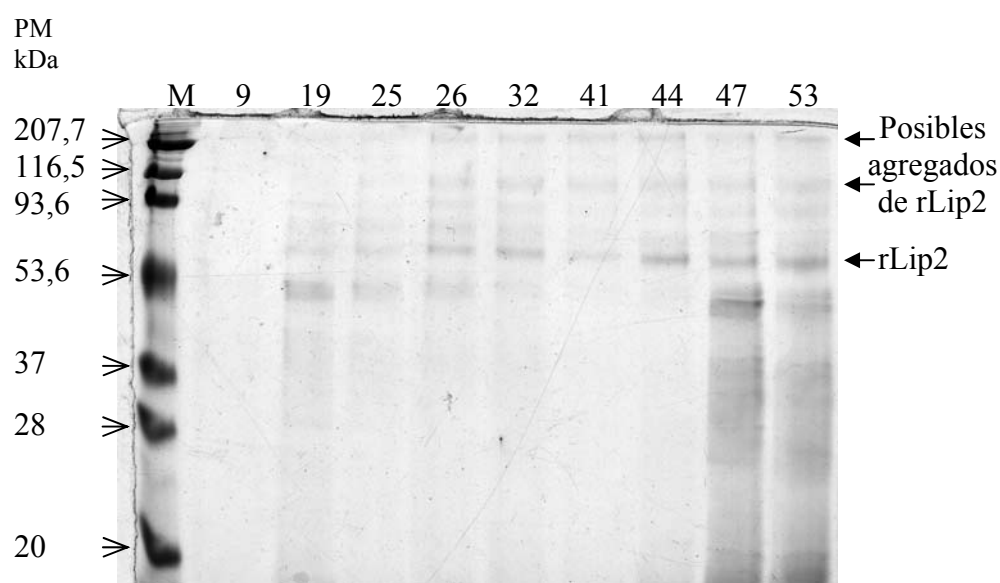


Fig. 5.19.- Gel SDS-PAGE al 12 % acrilamida revelado con solución de Coomassie, donde se aprecia las proteínas extracelulares en el tiempo para la fermentación 3. M.- Marcador de peso molecular. Se indica la posición en donde debiera encontrarse rLip2 con un PM de 62 KDa, y donde se encuentra el posible dímero de rLip2 con un PM de 116,5 KDa y superiores.

El análisis densitométrico de éste gel, mediante el software Quantity One v 4.6.2 de Laboratorios Bio-Rad, permitió determinar que a las 44 horas de fermentación se obtiene un 55,5 % de rLip2 a diferencia del tiempo final de la fermentación en que el porcentaje de rLip2 se reduce aproximadamente al 20% de la proteína excretada (Tabla 5.4). Esta disminución porcentual de rLip2 puede deberse a un efecto de lisis celular que se puede relacionar con el brusco incremento de la proteína extracelular observado en las últimas horas de fermentación (Figura 5.16). Los altos niveles finales de proteína extracelular por gramo de biomasa detectados en la fermentación 2 podrían ser debidos a efectos más acusados de lisis celular en esta fermentación.

Tabla 5.4. Porcentaje y concentración de la proteína rLip2 en la fermentación 3.

Tiempo de fermentación horas	% rLip2	Concentración rLip2 µg/mL
44	55,5	181,1
53	19,9	141,1

La concentración menor de rLip2 obtenida a las 53 horas puede ser debido a un efecto de proteólisis, siendo importante controlar el punto final de fermentación para evitar los fenómenos de lisis celular observados. En cualquier caso la rLip2 total obtenida al final de la fermentación es de 705 miligramos lo que permite calcular que el valor de la actividad específica de la rLip2 es 6896 U/mg de rLip2.

5.3.1.-Liofilización de la proteína rLip2

Para obtener mayoritariamente la Lip2 en forma sólida se procedió a su liofilización. Con las lipasas nativas de *C. rugosa* la liofilización había demostrado ser el sistema más eficiente de la recuperación de la actividad lipásica al compararlo con sistemas de precipitación utilizando etanol y sulfato amónico como agentes precipitantes.

Sin embargo, tal como se muestra en la tabla 5.5, el proceso de liofilización provoca prácticamente la completa pérdida de actividad lipásica de la muestra liofilizada, cuando con las lipasas nativas de *C. rugosa* se recuperaba del orden del 90%. Cabe señalar que la estabilidad de las lipasas nativas frente a la liofilización podría estar relacionada a la presencia de un polisacárido de alto peso molecular co-secretado por *C. rugosa* y fuertemente asociado a las mismas (Sanchez *et al.*, 1999).

Este hecho llevó a la realización de ensayos de liofilización con la presencia de diversos aditivos que podrían estabilizar la actividad enzimática durante el proceso. Siguiendo el criterio de Krilgaard *et al.*, 1998, se utilizó polietilenglicol (PEG) debido a que fue el aditivo con el que obtuvieron mejores resultados en el mantenimiento de la actividad enzimática utilizando como modelo de enzima el factor humano XIII recombinante. Otro aditivo utilizado fue la lactosa ya que se utiliza como estabilizante por la casa comercial Sigma para la presentación de su producto lipasa de *Candida rugosa*. Finalmente también se experimentó con goma arábiga, compuesto que se ha referenciado que triplica la actividad de la lipásica pancreática porcina sobre triacetina cuando se incluye en el medio de reacción (Ferrato *et al.*, 1997).

Los resultados se recogen en la Tabla 5.5, donde se puede observar que la presencia de agentes estabilizantes permite recuperar entre un 20 y un 30% de la actividad según el aditivo utilizado. Aunque los valores de recuperación obtenidos son muy superiores a los que corresponden a la muestra sin presencia de aditivos, éstos continúan siendo bajos, por lo que se tiene que continuar investigando con otros aditivos y condiciones, con objeto de mejorar los rendimientos obtenidos.

Tabla 5.5.- Ensayo de liofilización, probando diferentes compuestos de estabilización.

Ensayos de liofilización	Act. Lipasa inicial	Act. Lipasa final	% de Actividad
	Unidades	Unidades	Remanente
Control sin aditivos	125000	1990,2	1,59
Goma arábica (1 g/L)	625000	148648,8	23,78
Lactosa (30 g/L)	625000	169900,4	27,18
PEG 8000 (1% w/v)	625000	135552	21,69

5.4.-Caracterización bioquímica de rLip2

Se realizaron algunos análisis para la caracterización bioquímica de la rLip2 partiendo del diafiltrado obtenido de la fermentación 3.

5.4.1.-Secuenciación del N-terminal de rLip2

Se procedió a la secuenciación de los cinco primeros residuos del extremo N-terminal del monómero, banda correspondiente al peso molecular de 62 kDa. Para ello se realizó un nuevo SDS-PAGE de la muestra diafiltrada por cuadruplicado reduciendo la concentración de poliacrilamida del gel del 12 al 7,5% para así facilitar la separación de las proteínas y su transferencia a la membrana de Nylon para el análisis de aminoácidos de las bandas seleccionadas (Figura 5.20). De estas bandas la que corresponde al dímero no se pudo determinar el N-terminal. De las otras tres sólo la que corresponde al peso molecular del monómero coincide con la secuencia esperada de aminoácidos de la lipasa de *C. rugosa*. Los resultados indican que, si bien la banda de 62 kDa no corresponde a una proteína pura, contiene un polipéptido con una secuencia N-terminal compatible con la forma madura de la Lip2 recombinante.

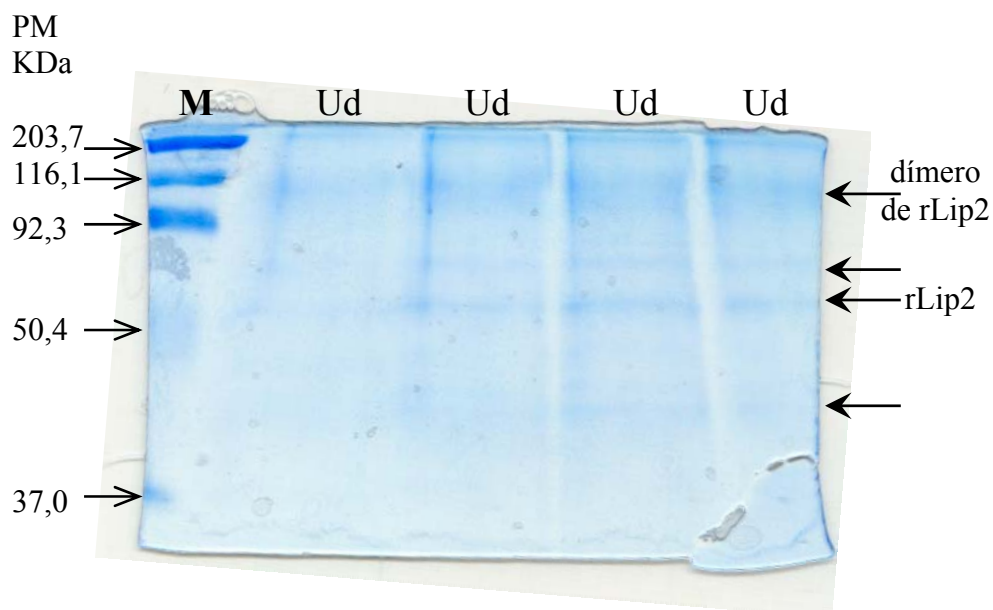


Fig. 5.20.- Gel SDS-PAGE al 7,5%, para la secuenciación de N-terminal de rLip2. M marcador de peso molecular, Ud dia-ultrafiltrado, Las ← indican las bandas secuenciadas.

5.4.2.-Análisis del grado de glicosilación

En el proceso de la glicosilación se adiciona un carbohidrato a otra molécula, esta molécula se denomina aceptor, que puede ser, por ejemplo, de naturaleza proteica o lipídica. Uno de los procesos de glicosilación más importantes es la glicosilación proteica, éste es el primero de los cuatro pasos principales de modificación postraduccional en la síntesis de las proteínas, por ende es el primer cambio que se puede apreciar en una proteína recombinante comparada con la nativa. Puesto que una proteína desglicosilada debiera dar un peso molecular semejante al peso molecular teórico se intentó realizar la N-desglicosilación enzimática de la proteína rLip2 mediante la utilización de endogluconasas. Sin embargo, este análisis no permitió determinar de manera precisa del grado de glicosilación. De todas maneras, partiéndose del valor del peso molecular obtenido de la Lip2 nativa de *Candida rugosa* desglicosilada (Sánchez *et al.* 1999) correspondiente a 55.7 kDa se puede estimar, por diferencia, el grado de glicosilación de la rLip2 (PM 62 kDa.) que corresponde al 10%, superior al 3.5% observado con la lipasa nativa.

5.4.2.1.- Producción y purificación de Lip2 en *Escherichia coli*.

Una nueva estrategia para estimar el grado de glicosilación de rLip2 y comprobar si presenta actividad lipolítica la forma desglucosilada consistió en la expresión de rLip2 en *Escherichia coli* mediante el plásmido de expresión pET21 (Fig. 4.6, en materiales y metodos), puesto que a partir de un microorganismo procariota se obtiene la proteína desglucosilada. Cabe señalar que éste sistema de expresión permite producir la rLip2 fusionada a una cola de histidina para así facilitar su purificación a partir de lisados celulares de *E. coli*/pET21 $rlip2$ (Fig. 5.21).

Realizado el cultivo de la cepa *E. coli*/pET21 $rlip2$ se detectó por SDS-PAGE la presencia de rLip2 posterior a la inducción con IPTG, tal y como revela la aparición de una banda de proteína correspondiente, aproximadamente, al peso molecular desglucosilado (Fig. 5.22).

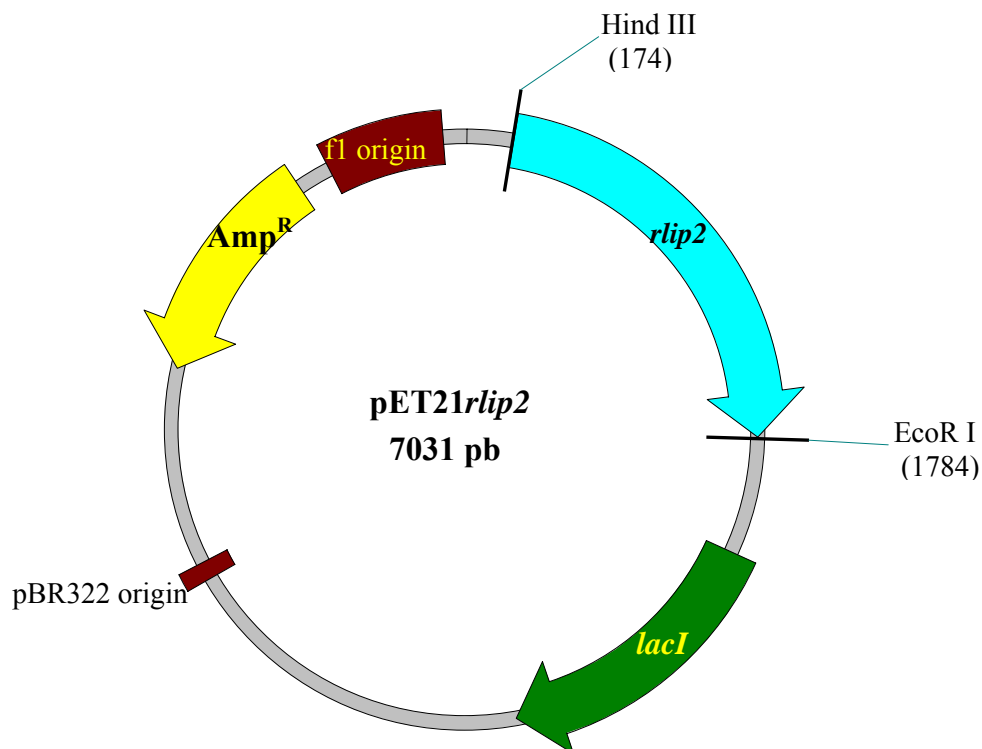


Fig. 5.21.- Plásmido pET21 $rlip2$, se indican la resistencia a la ampicilina y el gen *rlip2* con sus diana de restricción entre otras características.

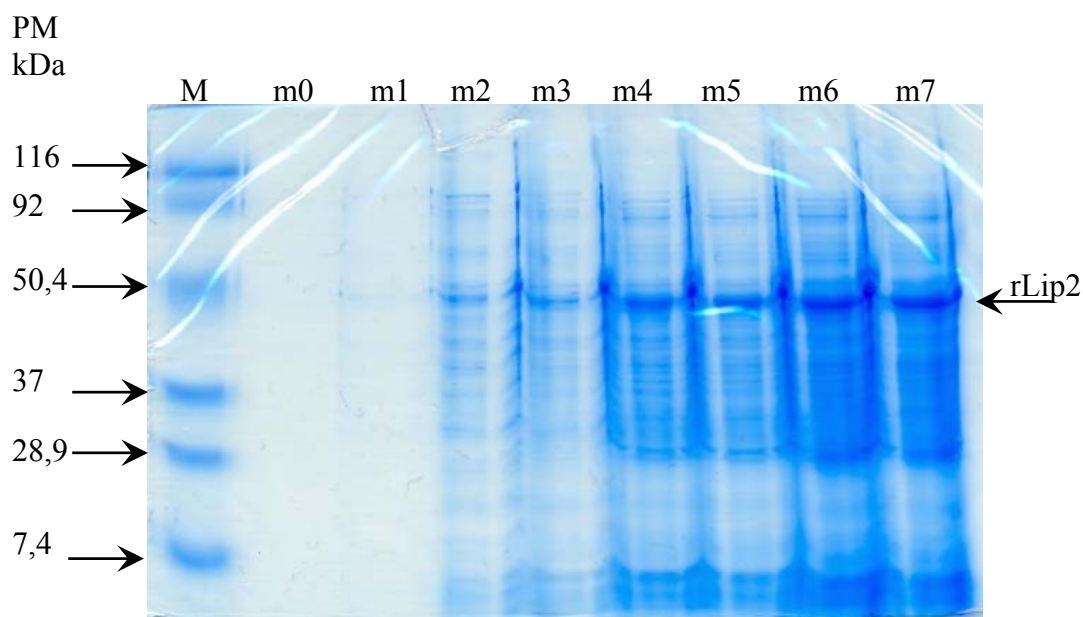


Fig. 5.22.- Monitoreo, en Gel de SDS-PAGE al 12%, de la fermentación de producción de rLip2 en *E. coli*, M marcador de peso molecular, m0 muestra antes de la inducción con IPTG, muestras m1-7 muestras del cultivo en el tiempo con IPTG como agente inductor de la producción de rLip2.

Para una mejor determinación de la banda de rLip2 se procedió a la purificación de la proteína desglicosilada mediante cromatografía de afinidad a metales quelados (columna HisTrap de General Electric), técnica que permite purificar proteínas con cola de histidina. Se aplicó la técnica de gradiente de pH en tampón con alta carga de urea (condiciones desnaturalizantes). El tratamiento con urea permite solubilizar los posibles cuerpos de inclusión y minimizar los efectos de agregación. Las fracciones eluidas de la purificación se analizaron por SDS-PAGE no obteniéndose ninguna fracción con rLip2 pura. El uso alternativo de un gradiente de imidazol no mejoró los resultados obtenidos con el gradiente de pH.

Las fracciones en las que se detectó la presencia de rLip2 se procesaron conjuntamente a través de una columna de gel filtración Sefadex 70. No obstante no se pudo determinar la actividad específica de la enzima desglicosilada porque el análisis de proteína SDS-PAGE reveló que no se había obtenido la proteína pura (Fig. 5.23). Donde se encuentra la mayor concentración de proteína rLip2, son los puntos en donde encontramos una mayor presencia de otras proteínas, estos puntos para una mayor purificación podrían ser pasados por columna de afinidad iónica (columna de fenil-sefarsa), con lo cual y en base a la alta hidrofobicidad que presenta Lip2 de *Candida*

rugosa, característica compartida por la proteína recombinante rLip2, se podría realizar un nuevo paso de purificación aumentando la pureza de la proteína rLip2.

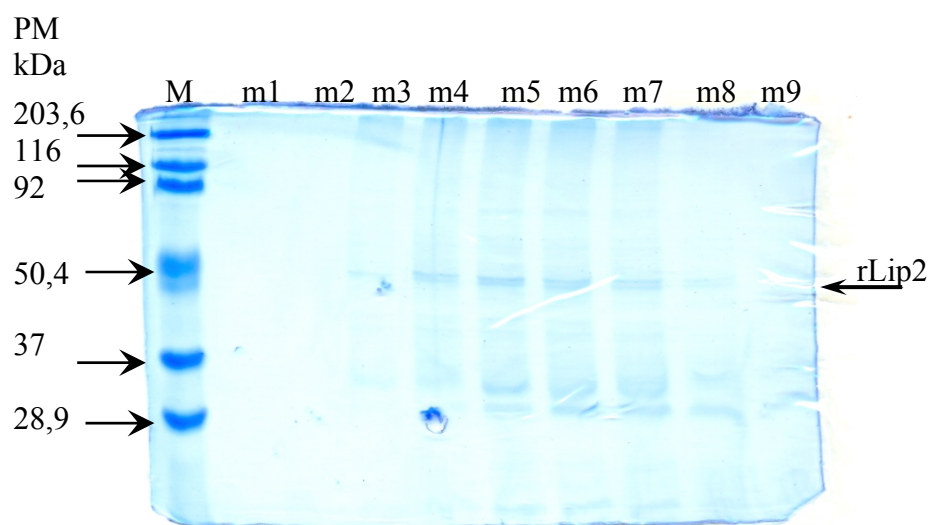


Fig. 5.23. Muestra de un gel SDS-PAGE al 12% del proceso de purificación de proteína mediante gel Filtración, M marcador de peso molécula, mx indica el nombre de la muestra durante el tiempo de elusión de las proteínas.

Es de destacar que la solución con el concentrado de proteínas al final del proceso de gel filtración presentó actividad lipásica.

El peso molecular estimado a partir de SDS-PAGE es de 54,5 kDa, ligeramente inferior al teórico 55,7 kDa. Teniendo en cuenta que el PM de la rLip2 producida en *Pichia pastoris* era de 62 kDa, el porcentaje de glicosilación calculado fue del 12%.

5.5.- Caracterización funcional de rLip2

Para la caracterización funcional de rLip2 se utilizaron muestras diafiltradas, estudiándose diversos factores que afectan a la actividad de la enzima: fuerza iónica, temperatura y pH. Además se procedió a la realización de estudios de estabilidad a 4° C, a -20°C y del efecto ocasionado por sucesivas congelaciones y descongelaciones en la actividad enzimática.

5.5.1.-Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad lipásica.

El hecho de que la actividad lipásica de los cultivos en discontinuo alimentado de *P. pastoris* se detectara después de realizar el proceso de diafiltración del medio de cultivo, al término de las respectivas fermentaciones, indica que la fuerza iónica podría ejercer algún efecto sobre la actividad lipásica. Así pues, en primer lugar, se determinó la

fuerza iónica, mediante conductividad, de los medios utilizados para la producción de rLip2 en discontinuo y en discontinuo alimentado (Tabla 5.6).

Tabla 5.6.- Conductividad de los diferentes medios utilizados para el cultivo de *Pichia pastoris*.

Medio	Conductividad (mS/cm)	
	1	2
BMM	26.3	25.8
INVITROGEN	45.2	44.8
H ₂ O _d	0.664	-

1.- Medio sin metanol, ni trazas minerales, ni biotina; 2.- Medio con metanol, con trazas minerales y con biotina

Como se puede observar, efectivamente, el medio de fermentación en discontinuo alimentado (Invitrogen) presenta una conductividad prácticamente el doble de la observada en el medio de fermentación utilizado en discontinuo (BMM).

Para cuantificar el efecto de la fuerza iónica sobre la actividad lipásica se realizaron ensayos de la misma trabajando con un medio con la misma relación de sales que el medio Invitrogen en un rango creciente de concentraciones de manera que las conductividades medidas estaban entre 10 y 15 mili Siemens/centímetro (mS/cm).

Se ha de indicar que en el proceso de análisis de actividad lipásica para conductividades altas, superiores a 15 mS/cm, se generaba un precipitado en las cubetas, supuestamente debido a la agregación de las lipasas en condiciones de hidrofobicidad, dada la elevada fuerza iónica (Pernas 2003). El precipitado formado falseaba las lecturas de absorbancia, ya que estaríamos midiendo por error turbidez al interior de las cubetas, obteniéndose valores dispersos y poco repetitivos. Sin embargo para una conductividad de 75 ms/cm el precipitado formado sedimentaba rápidamente y se pudieron obtener medidas de absorbancia sin distorsión.

En la figura 5.24 se puede observar el efecto que ejerce la fuerza iónica sobre la actividad enzimática para conductividades de 10,15 y 75 mS/cm. Si bien se observa un ligero aumento con el tiempo para la actividad enzimática de la solución de 10 mS/cm, probablemente debido a la desagregación de proteínas, el experimento demuestra el efecto negativo del aumento de la fuerza iónica del medio en la actividad lipásica. Esto concuerda con el hecho de que en las fermentaciones en discontinuo alimentado la actividad lipásica no se detectase, a diferencia de las realizadas en discontinuo donde la

fuerza iónica era menor. Aunque la fuerza iónica del medio Invitrogen utilizado en fermentaciones en discontinuo alimentado no supondría la pérdida total de la actividad enzimática, contribuye a la que deriva de la alta concentración de proteína recombinante obtenida en este tipo de fermentaciones.

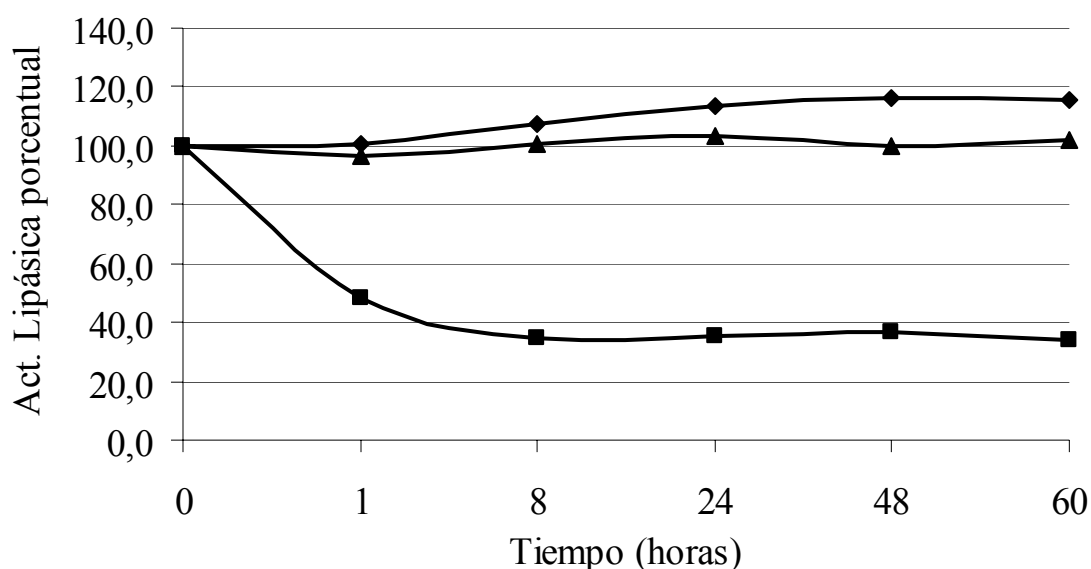


Fig. 5.24. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad lipásica. ◆ 10 mS/cm; ▲ 15 mS/cm; ■ 75 mS/cm.

Así pues, en fermentaciones de *Pichia pastoris* en discontinuo alimentado produciendo proteínas con tendencia a agregarse, sería necesario utilizar medios de menor salinidad que el recomendado por Invitrogen, o alternativamente alimentar las sales progresivamente conjuntamente con el sustrato.

5.5.2.-Efecto de la temperatura sobre la actividad lipásica.

Para la determinación de la temperatura óptima de la enzima rLip2 se procedió a realizar el análisis de actividad lipásica con el kit de detección Roche como se indica en materiales y métodos a distintas temperaturas, en un rango entre 20 y 70° C con un intervalo de 5 grados.

Los resultados del efecto de la temperatura sobre la actividad lipásica, expresada como porcentaje respecto al valor máximo, se pueden observar en la Fig. 5.25, en donde se aprecia que la máxima actividad lipásica se encuentra entre 35 y 40°C, lo que es

concordante con lo expuesto en la bibliografía (Lee *et al.*, 2002). Asimismo se puede observar que la actividad enzimática de la rLip2 disminuye de manera exponencial a partir de 40°C hasta inactivarse completamente al llegar a los 70°C.

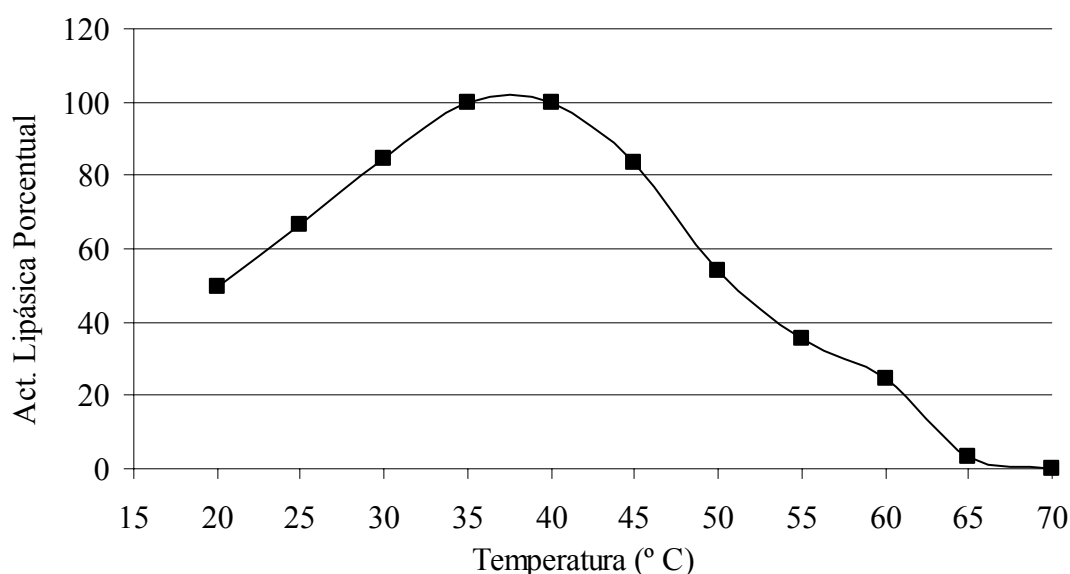


Figura 5.25. Efecto de la temperatura sobre la actividad lipásica de rLip2.

5.5.3.- Efecto del pH sobre la actividad lipásica.

Para el análisis del pH sobre la actividad lipásica se procedió a modificar el tampón de reacción en el análisis de actividad lipásica como se describe en la sección 4.5.6.3 de Materiales y métodos.

En la figura 5.26, se presenta el efecto del pH sobre la actividad enzimática de rLip2, expresada como porcentaje respecto al valor máximo, en donde se aprecia un aumento en la actividad lipásica desde pH 5,0 hasta 7,0; punto en el cual se registra la máxima actividad lipásica. La actividad enzimática decae significativamente, a partir de pH 7,5; lo que es coincidente con el comportamiento detectado para la lipasa 2 nativa de *C. rugosa* (Pernas 2003) y para la lipasa recombinante expresada con promotor GAP (Lee *et al.*, 2002).

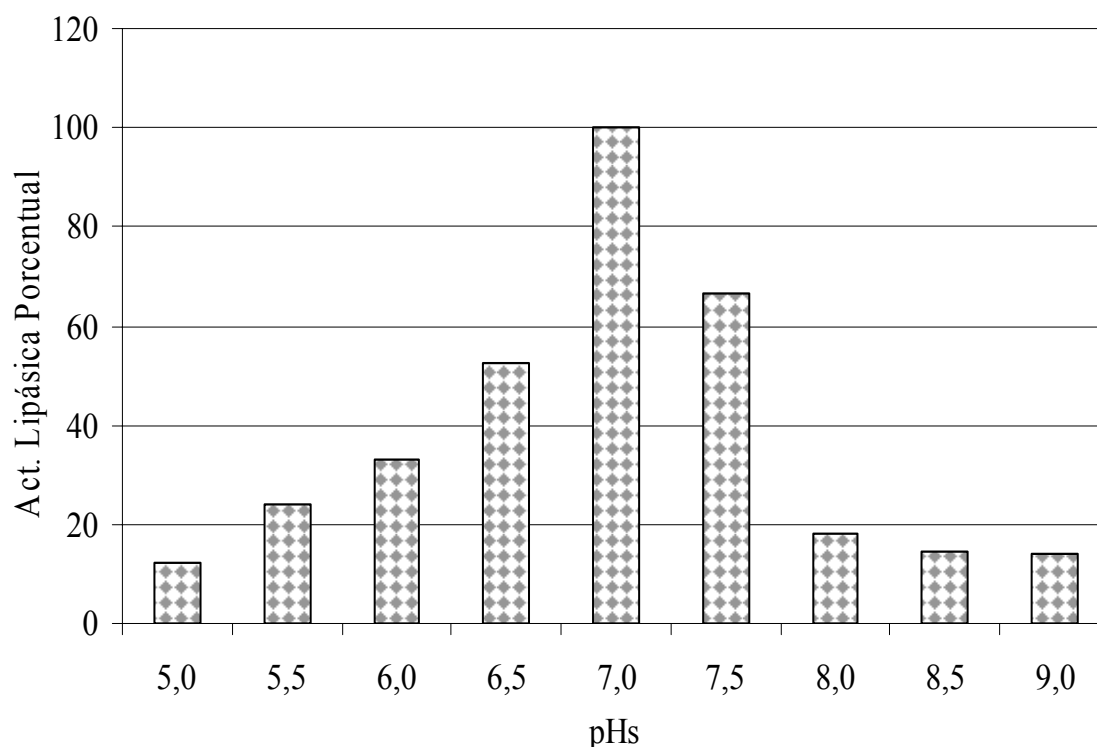


Figura 5.26.- Efecto del pH sobre la actividad lipásica de rLip2.

5.5.4.- Especificidad frente a p-nitrofenoles y triglicéridos.

Una de las maneras clásicas de comprobar la especificidad de las lipasas es realizar reacciones de hidrólisis de ésteres frente a diversos sustratos solubles e insolubles con distinta longitud de cadena del ácido orgánico correspondiente, pudiendo, además, ser este ácido saturado o insaturado. Normalmente, los sustratos utilizados son ésteres de p-nitrofenol y triglicéridos naturales. Por lo que respecta a los ésteres del p-nitrofenol se utilizan habitualmente en análisis de actividad siendo indicadores preferentemente de actividad esterásica. A diferencia de éstos, los triglicéridos son los sustratos naturales de las lipasas con lo que se evalúa, fundamentalmente, la actividad lipásica, aunque la selección abarcó desde moléculas parcialmente solubles a otras totalmente insolubles. Los sustratos utilizados se detallan en el apartado 4.5.6.4 de Materiales y métodos.

El resultado de los experimentos realizados con ésteres de p-nitrofenoles de distinta cadena con la rLip2 se presenta en la fig. 5.27, expresándose el porcentaje de actividad referido al valor máximo obtenido. En la misma gráfica se presentan los resultados obtenidos para los mismos sustratos con la Lip2 nativa (López *et al.*, 2004).

Se puede observar como rLip2 no presenta una clara tendencia en la degradación sobre p-nitrofenoles aunque cabe destacar la máxima afinidad por el p-nitrofenol C8 seguida del C4 y C12. La nLip2 tampoco presenta una clara tendencia, pero a diferencia de la rLip2 la mayor afinidad la presenta para la cadena de 12 carbonos, aunque para la fracción C8 también presenta un elevado grado de especificidad.

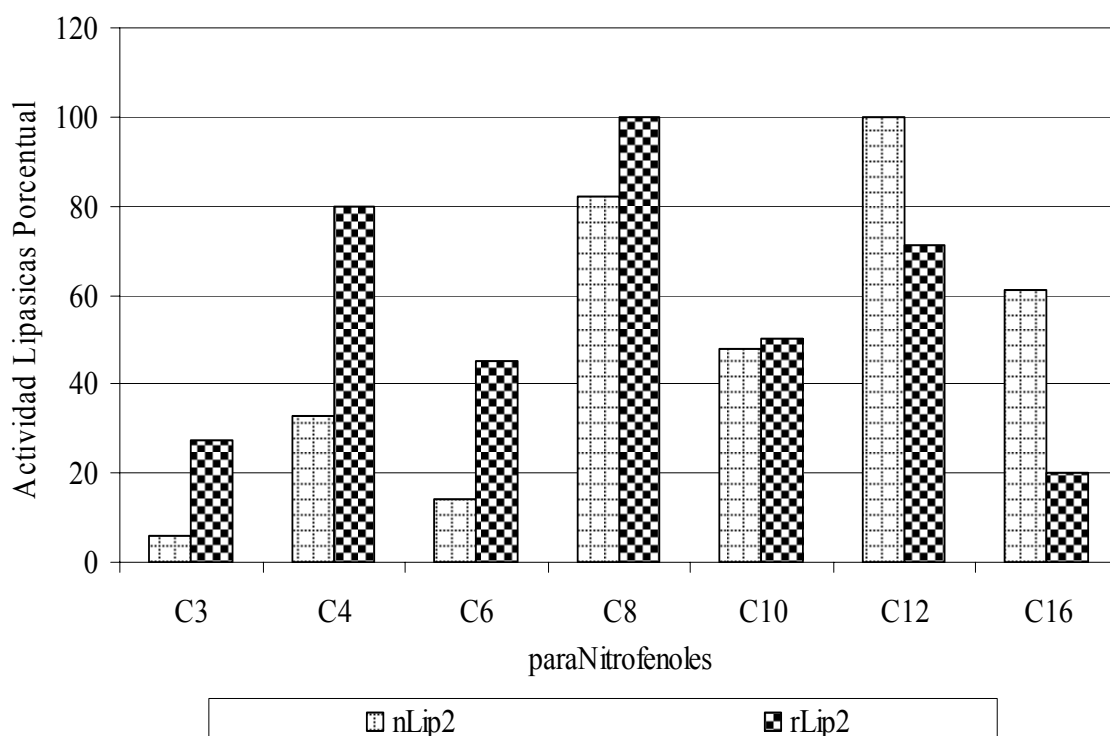


Fig. 5.27.- Actividad Lipásica porcentual de nLip2 y rLip2 en la degradación de p-nitrofenoles.

Los perfiles de afinidad en la acción enzimática de nLip2 y de rLip2, apuntan a que ambas enzimas se ven afectadas por un factor estructural, en vez de una especificidad dada por la longitud de la cadena. Sólo si se analiza la tendencia sin tener en cuenta los ésteres de p-nitrofenol de cadena C6 y C10 se observa un aumento del porcentaje de actividad con la longitud de cadena, hasta C8 para la rLip2 y C12 para la nLip2 donde se alcanza el valor máximo respectivamente. La dificultad de explicar estos resultados se encuentra relacionada con el complejo mecanismo de activación del centro activo de las lipasas.

En la Fig. 5.28 se presenta una gráfica comparativa ante *p*-nitrofenoles de diferentes cadenas de carbonos, de nuestra lipasa recombinante con el promotor AOX (rLip2 AOX) y la lipasa nativa (nLip2), frente otras lipasas: Lipasa comercial (Lip C), lipasa recombinante promotor GAP (rLip2 GAP) (Lee *et al.*, 2002). Se aprecia que el palmitato (C16) es el sustrato preferido por rLip2 GAP en tanto para nuestra rLip2 es el *p*-nitrofenol de 8 carbonos (caprilato), al igual que la lipasa comercial. Por otra parte, la lipasa nativa como ya se mencionó presenta una mayor afinidad por el *p*-nitrofenol de 12 carbonos en donde tanto la proteína recombinante rLip2 GAP como la rLip2 AOX presentan una actividad lipásica porcentual sobre el 60 % y la lipasa comercial cercana al 50 %.

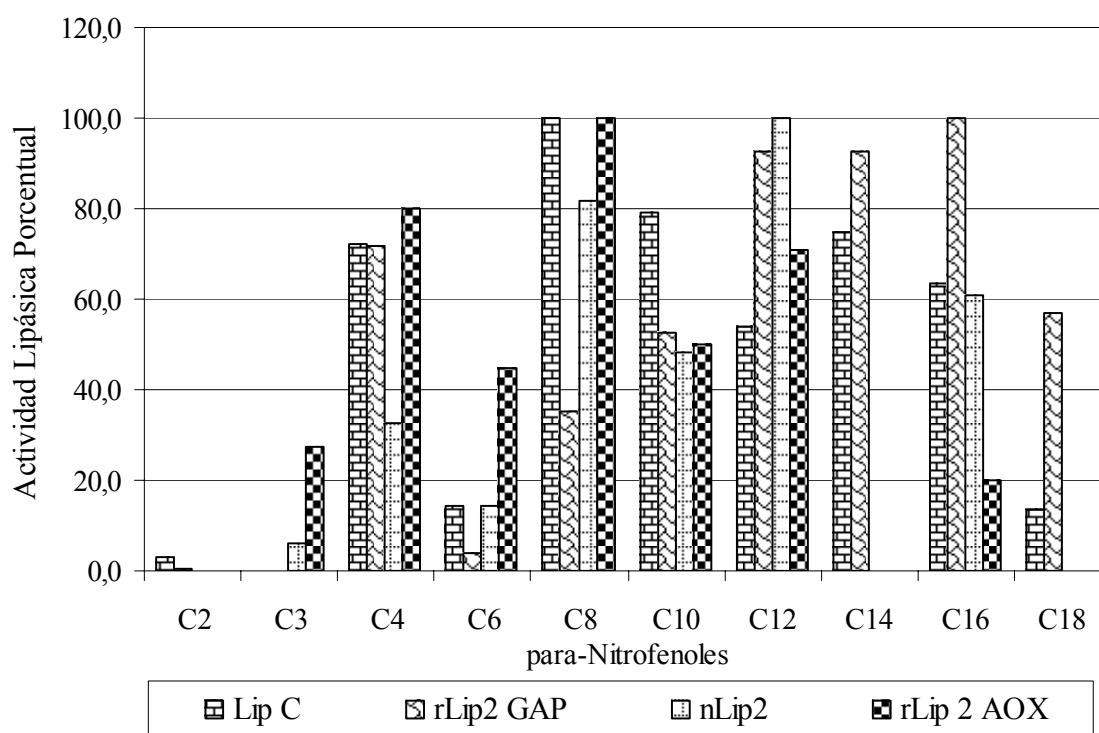


Fig. 5.28.- Comparación de la actividad lipásica porcentual de Lip2 de diversos orígenes sobre *p*-nitrofenoles.

En cuanto a la determinación de la actividad lipásica de rlip2, se utilizaron sus sustratos naturales, triglicéridos en el rango de C2 a C18 y los valores obtenidos se compararon con los correspondientes para la nLip2.

En la fig. 5.29, se puede apreciar la actividad lipásica porcentual relativa al valor máximo obtenido, con los datos de los que se dispone, la rLip2 presenta un aumento de actividad hasta alcanzar el máximo en el triglicérido C8. Nuevamente, se detecta el

mismo fenómeno que para los ésteres de p-nitrofenoles en que la cadena C6 no sigue esta tendencia.

La nLip2 presenta un comportamiento claramente diferente, si bien para el triglicérido C6 presenta también un valor bajo, para el C4, C8 y el C18 insaturado (trioleína), se obtienen valores muy similares de actividad enzimática, destacándose el máximo en C18 insaturado.

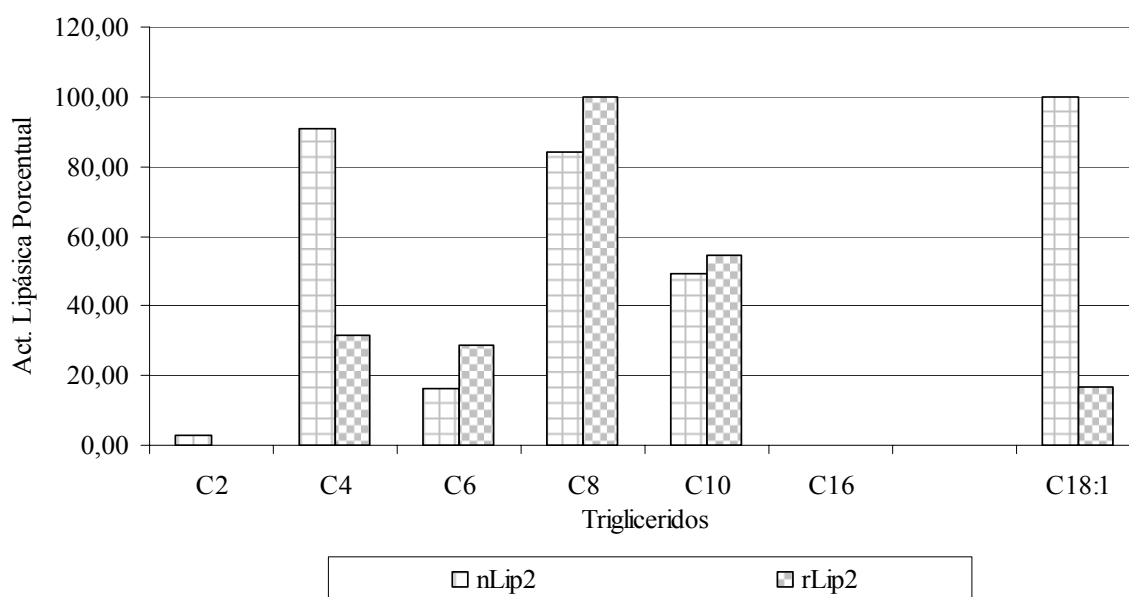


Fig. 5.29.- Actividad lipásica porcentual de nLip2 y rLip2 sobre triglicéridos

En la Fig. 5.30, se presenta una gráfica comparativa, entre las diferentes lipasas ya mencionadas en el caso de los análisis con p-nitrofenoles, ante triglicéridos conteniendo ácidos grasos de diferentes longitud de cadenas de carbonos. Se aprecia que la rLip2 GAP es más activa para triglicéridos de cadena corta obteniendo el 100% de actividad lipásica porcentual para la tributirina (C4), substrato para el cual la nLip2 presenta una afinidad cercana al 90%, por otra parte tanto la lipasa comercial como nuestra rLip2 AOX presentaron la máxima afinidad por la tricaprilina (C8), substrato para el cual la lipasa nativa presenta un 80% de afinidad. En cuanto a la trioleína (C18:1), por la que la lipasa nativa presenta mayor afinidad, las enzimas recombinantes y la lipasa comercial solo presentan entre un 10 y un 20 % de afinidad.

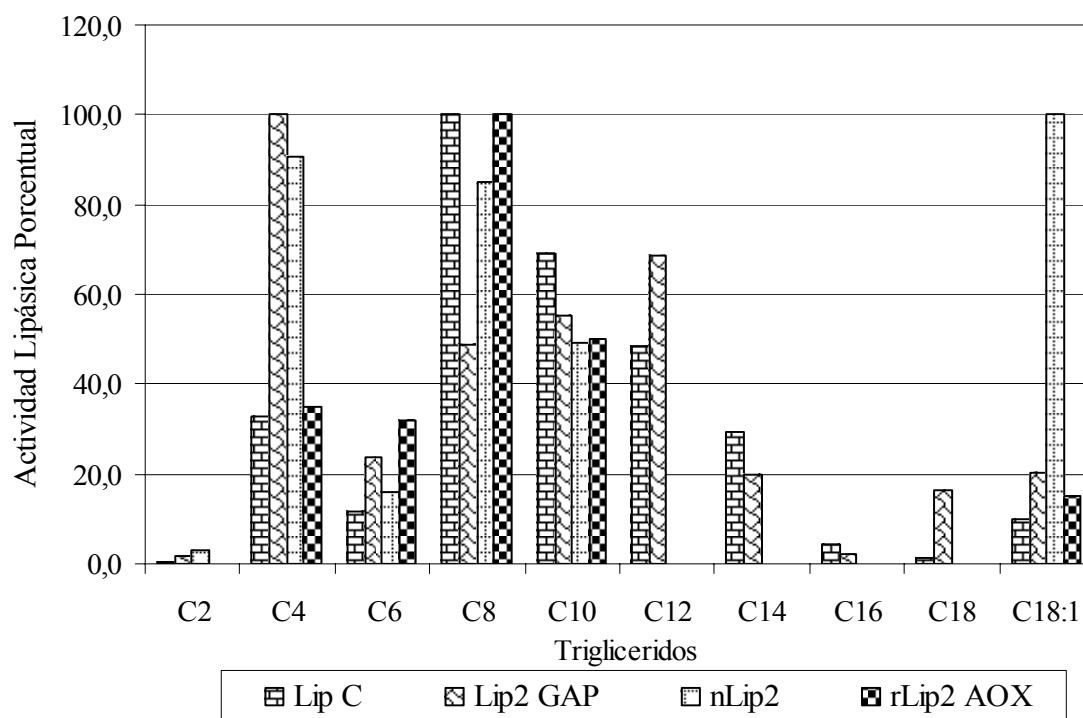


Fig. 5.30.- Comparación de la actividad lipásica porcentual de Lip2 de diversos orígenes sobre triglicéridos.

En general pues, se puede afirmar que la mayor especificidad para la rLip2 AOX, tanto para el análisis de p-nitrofenoles como de triglicéridos, se aprecia para los compuestos de cadena mediana (C8).

5.5.5.- Estabilidad enzimática a bajas temperaturas.

Al realizar el proceso de liofilización se obtuvieron pérdidas significativas de actividad incluso cuando se utilizaban aditivos que pudiesen ayudar a mantener la actividad enzimática. Así pues, aunque la liofilización es una técnica utilizada para permitir un mejor almacenamiento de la proteína de interés, en nuestro caso este proceso no fue exitoso. Por este motivo se han de probar métodos alternativos de almacenamiento para nuestra enzima (rLip2).

En principio, se consideró el frío como método de conservación de la enzima y se dispuso a observar su estabilidad en el tiempo a 4° C, congelada a -20° C y el efecto que provoca el proceso sucesivo de congelación (-20° C) y descongelación a temperatura ambiente.

Se encuentra ampliamente referenciado que el aumento de la concentración de proteína facilita la agregación de las lipasas (Pernas 2003). Por este motivo se realizaron los estudios para tres concentraciones de proteína total a partir de un stock diafiltrado (200

mg/L) tal como se muestra en la Tabla 5.7. En ella se puede observar que la actividad específica de la muestra más concentrada es menor, corroborando la información bibliográfica.

Tabla 5.7.- Concentraciones y sus respectivas actividad lipásica para ensayos de estabilidad.

Muestra	Proteína total (mg/L)	Act. lipásica (U/mL)	Act. lipásica esp. (U/mg)
1	15	42	2800
2	100	58	580
3	200	52	260

5.5.5.1.-Estabilidad enzimática a 4° C

Siguiendo la actividad enzimática de las muestras sometidas a 4°C por un periodo de aproximadamente 50 h, para las concentraciones 1 y 2 (15 y 100 mg/L), no se observaron cambios significativos excepto un ligero aumento de actividad, no superior al 20%, para la concentración de 100 mg/L.

En cuanto a la concentración 3 (200 mg/L), se observó un claro aumento de actividad lipásica a medida que aumentaba el tiempo de conservación a 4°C. Como se observa en la figura 5.31, a partir del día 20 se observa un aumento constante de la actividad lipásica debido, probablemente, a la liberación del monómero responsable de la actividad enzimática.

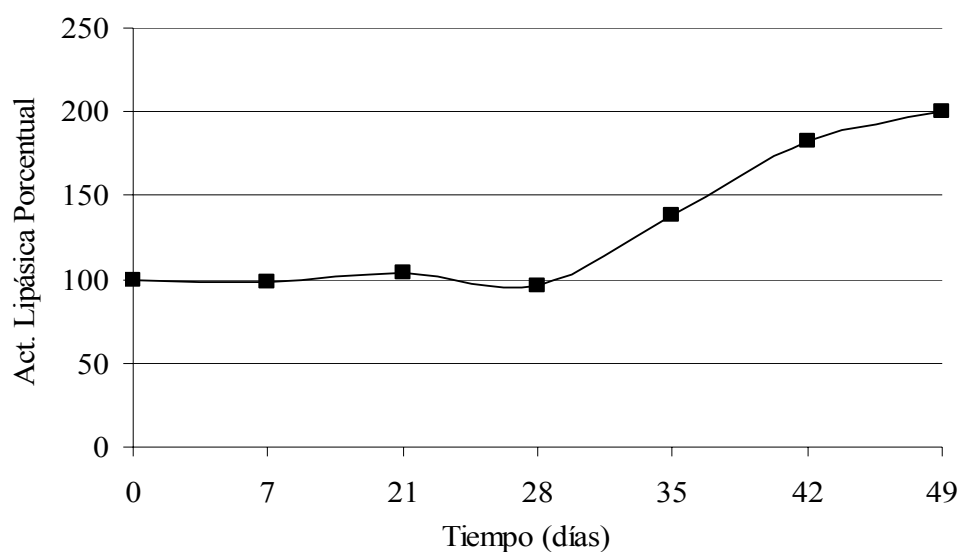


Fig. 5.31.- Efecto del almacenamiento a 4° C sobre la actividad lipásica de rLip2, para la concentración 3 (200 mg/L).

5.5.5.2.- Estabilidad enzimática a -20°C.

En la figura 5.32 se puede observar la estabilidad enzimática a -20°C, por un periodo de aproximadamente 50 h, para las distintas concentraciones ensayadas (Tabla 5.7). Las concentraciones 1 (15 mg/L) y 2 (100 mg/L) presentan un decrecimiento de la actividad lipásica, para la concentración 1 alrededor del 25% de actividad total, en tanto que para la concentración 2 un decrecimiento de alrededor del 50%. A diferencia de esta tendencia, la concentración 3 presenta un incremento en la actividad lipásica con el tiempo a partir de la cuarta semana que llega a ser del 150%. El efecto del tiempo de congelación es negativo para la actividad lipásica como se aprecia para bajas concentraciones. En cambio, para concentraciones elevadas, la tendencia es similar al experimento realizado a 4°C, donde se observa un aumento de la actividad seguramente debido al aumento de la presencia del monómero que compensa con creces el efecto negativo del tiempo de congelación.

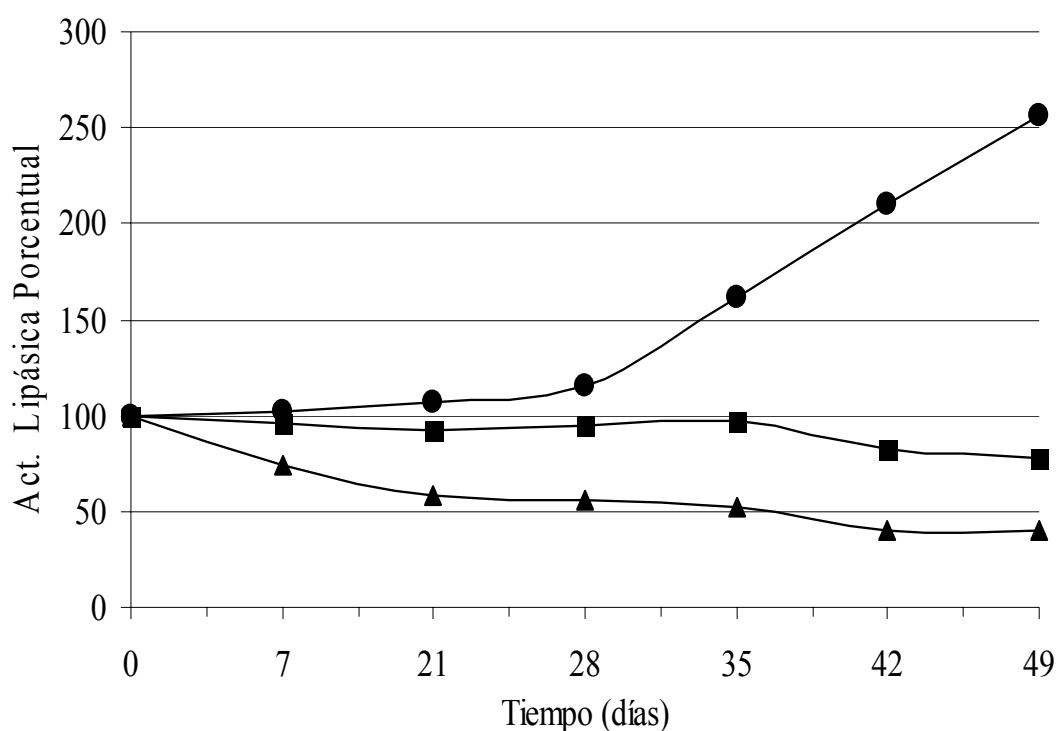


Figura 5.32.- Efecto del almacenamiento sobre la actividad enzimática de rLip2 mediante congelación a -20° C. ▲ concentración 1, ■ concentración 2; ● concentración 3.

5.5.5.3.- Efecto provocado por la congelación y descongelación sucesivas sobre la actividad lipásica.

En los procesos de conservación enzimática lo normal es mantener alícuotas de solución enzimática y así solo descongelar lo necesario para las reacciones a realizar. Si este procedimiento no se realizara someteríamos las muestras de soluciones enzimáticas a sucesivas congelaciones y descongelaciones. Para estudiar el efecto indicado sobre la actividad de rlip2, se dispuso a congelar a -20°C , 3 viales que contenían muestras con las concentraciones indicadas de la tabla 5.7. Los viales se descongelaban para realizar el análisis de actividad enzimática y se volvían a congelar de forma sistemática durante 7 semanas. Como se aprecia en la figura 5.34, cualitativamente el efecto es similar al observado en el estudio de la estabilidad enzimática a -20°C . Por consiguiente, el efecto de congelación y descongelación sucesivas no supone un efecto negativo añadido al observado en el anterior estudio, por lo que la conservación de toda la muestra enzimática de forma conjunta no supondría una alteración mayor.

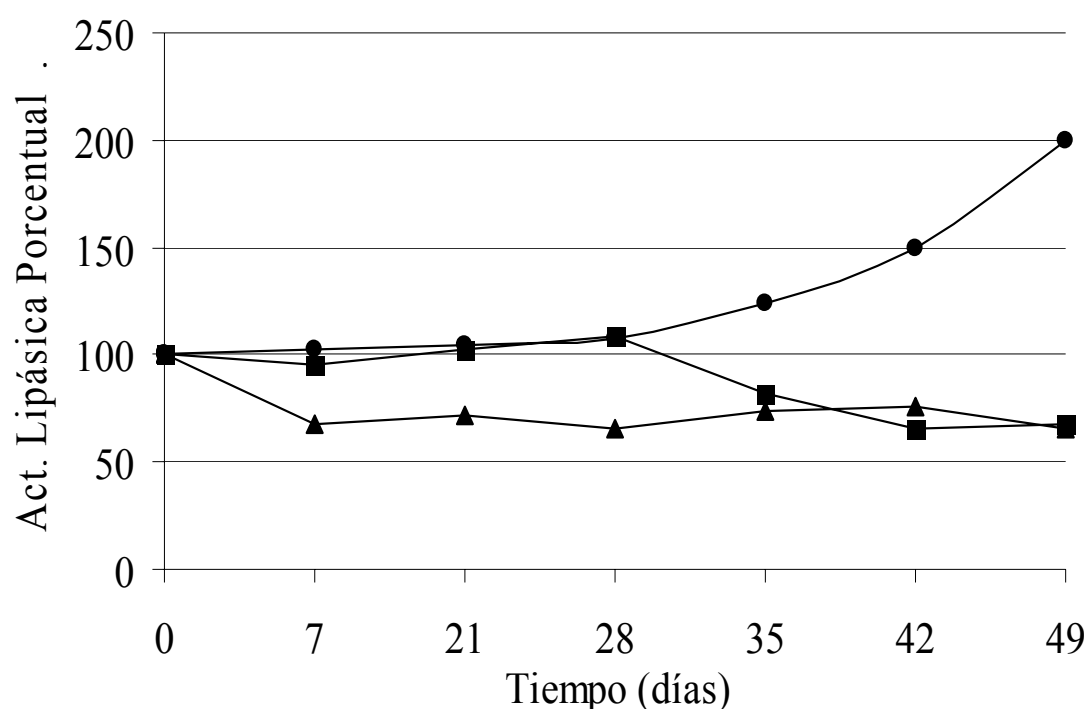


Figura 5.33.- Efecto de la congelación y sucesivas descongelaciones sobre la actividad enzimática de rLip2. ▲ concentración 1, ■ concentración 2; ● concentración 3.

5.5.6.- Estudio comparativo de la estabilidad entre la nlip2 y rlip2.

Se procedió a realizar un estudio sistemático de estabilidad de rLip2 en solución acuosa frente al efecto conjunto de variación de pH y temperatura y su posterior comparación con la enzima nLip2 (Lip2 nativa de *C. rugosa*), estudio realizado anteriormente dentro del grupo de investigación (López *et al.*, 2004).

Este estudio se realizó en colaboración con el grupo de la Dr. Marisa Rúa del Area de Bioquímica e Biología Molecular de la Universidad de Vigo en su laboratorio del campus universitario de Orense que es de referencia en la caracterización de las lipasas de *Candida rugosa*.

El estudio de estabilidad se realizó midiendo el análisis de la actividad enzimática del biocatalizador después de incubarse durante una hora a unas determinadas condiciones de pH y temperatura utilizando como medida de la actividad enzimática el test de la tributirina (Ver Materiales y Métodos). Se realizó un diseño factorial de experimentos, ya que, contrariamente al procedimiento clásico consistente en ensayar separadamente cada variable independiente, se requieren menos experimentos para calcular las verdaderas condiciones óptimas de estabilidad y los resultados permiten ser expresados mediante ecuaciones polinómicas que describen las interacciones existentes entre las variables estudiadas.

Se utilizó un diseño ortogonal de segundo orden para estudiar el efecto combinado del pH y la temperatura sobre la estabilidad de la rLip2 (Akhazarova, S. *et al.*, 1982). El diseño consistió en 13 experimentos con 4 puntos factoriales (2^2) y 4 puntos axiales para formar un diseño centrado con $\alpha = 1.267$, realizándose 5 análisis en el punto central que se utilizan como réplicas. El rango de pH analizado se situó entre 5 y 9, mientras que el de temperatura se situó entre los 30°C y 50°C, rangos seleccionados de acuerdo a la información de la que previamente se disponía. El diseño de puntos experimentales se recoge en la figura 5.34.

Los resultados obtenidos a las diferentes condiciones, valores reales y normalizados, expresados como porcentaje de actividad referida al valor máximo alcanzado se presentan en la tabla 5.8.

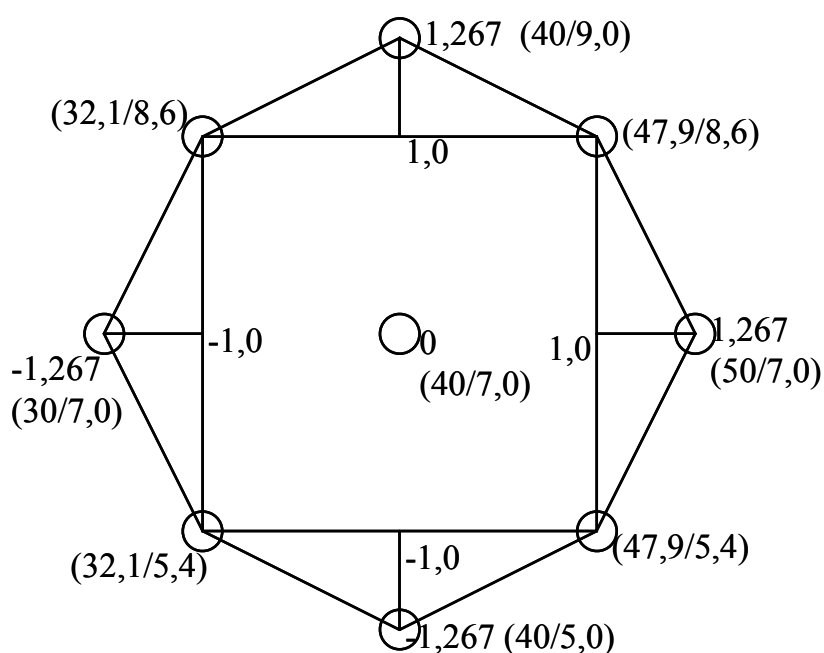


Figura 5.34.- Distribución de los puntos experimentales (valores normalizados), entre paréntesis temperatura y pH (valores reales) al cual se realizaron las experiencias.

Tabla 5.8.- Resumen de los datos obtenidos en el diseño de experimentos para determinar la estabilidad rLip2 en solución frente a pH y temperatura,

Muestra	pH	pH normalizado	Temperatura °C	Temperatura normalizada	Act. Lipasica U/mL	% de actividad
1	5,0	-1.267	40,0	0	19,17	100,00
2	5,4	-1	32,1	-1	17,50	91,30
3	5,4	-1	47,9	1	13,93	72,67
4	7,0	0	30,0	-1.267	15,71	81,99
5	7,0	0	40,0	0	8,75	45,65
6	7,0	0	40,0	0	7,64	39,84
7	7,0	0	40,0	0	8,38	43,70
8	7,0	0	40,0	0	8,25	43,04
9	7,0	0	40,0	0	8,75	45,65
10	7,0	0	50,0	1.267	1,62	8,46
11	8,6	1	32,1	-1	5,71	29,81
12	8,6	1	47,9	1	0,00	0,00
13	9,0	1.267	40,0	0	0,70	3,65

A partir del valor del porcentaje de actividad residual de la rLip2 obtenido en el diseño de experimentos se obtuvo la siguiente ecuación empírica que describe el porcentaje de

actividad residual de la lipasa recombinante, en función de las condiciones de pH y temperatura a las que se somete la enzima para su estudio sistemático de estabilidad. Los valores de pH y temperatura a emplear son los normalizados en el rango determinado por α entre -1.267 y 1.267.

$$\% \text{ de actividad residual} = 29 - 23 \text{ pH} - 13 T + 3 \text{ pH}^2$$

La superficie de respuesta obtenida, extrapolada hasta el valor de $\alpha = 1.5$ se presenta en la figura 5.35.

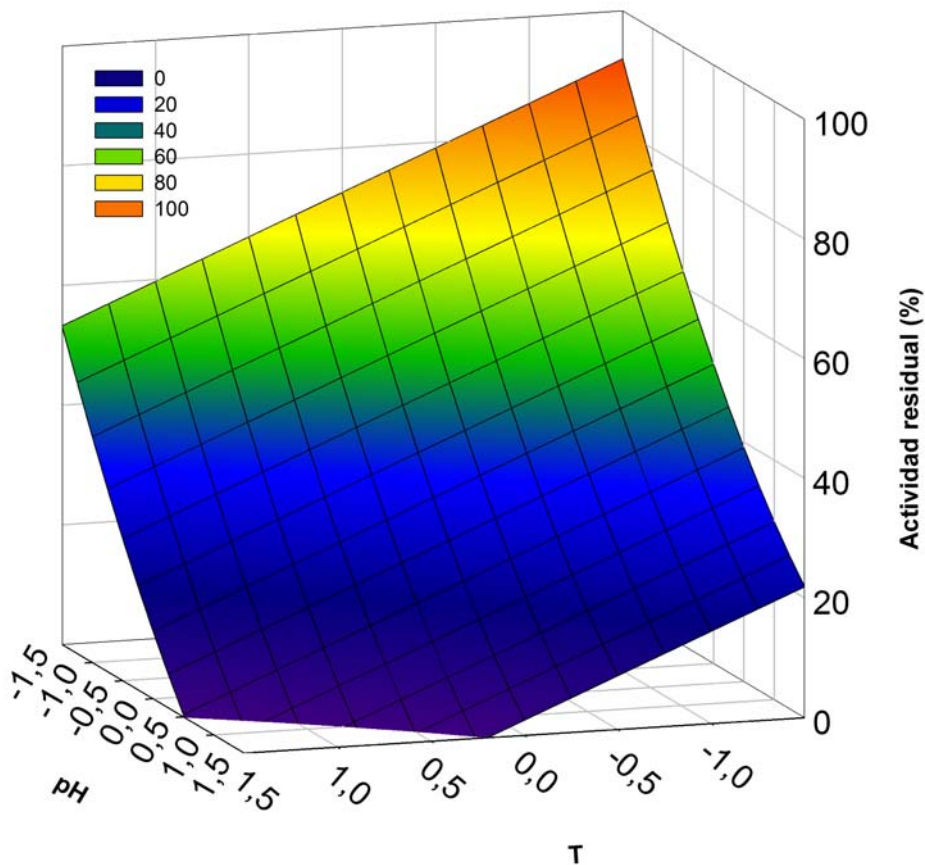


Fig. 5.35.- Superficie de respuesta expresada como actividad residual de rLip2 frente pH-Temperatura.

Los resultados previamente obtenidos aplicando la misma metodología para la nLip2 se presentan en la figura 5.36 donde la superficie de respuesta corresponde a la ecuación:

$$\% \text{ de actividad residual} = 90 - 34 \text{ pH} - 14 T - 16 \text{pH} T - 26 \text{pH}^2$$

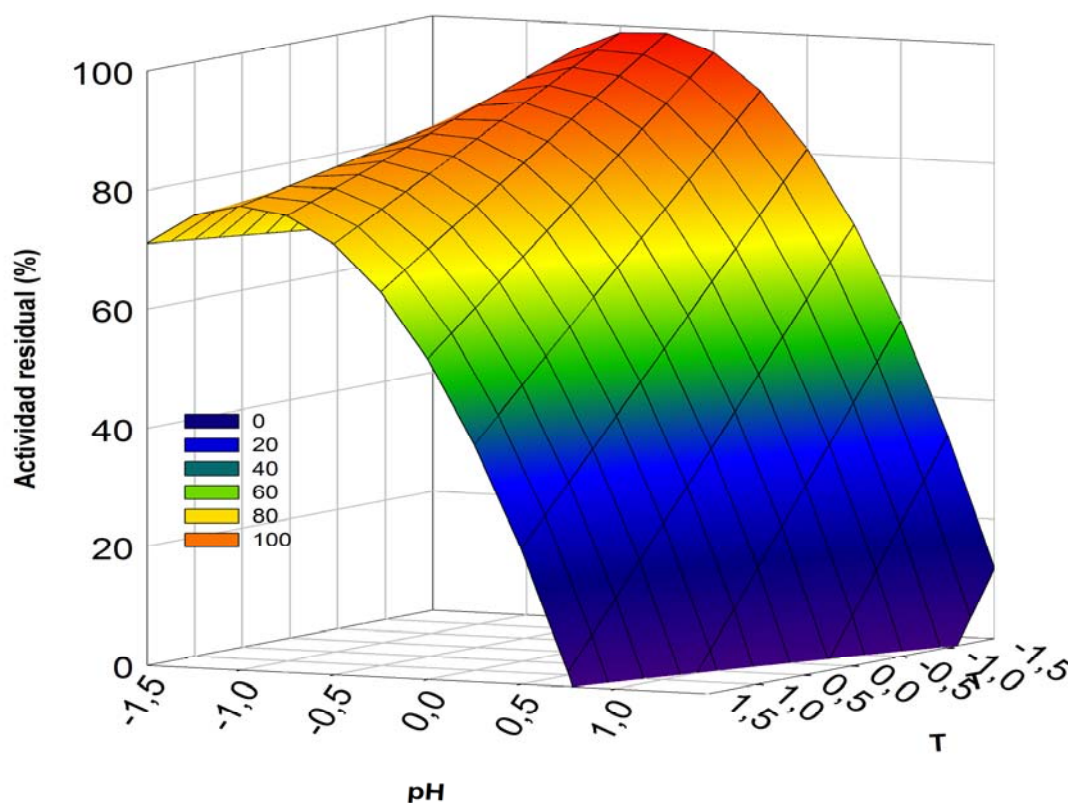


Fig. 5.36.- Superficie de respuesta expresada como actividad residual de nLip2 frente pH-Temperatura.

De la comparación se observa claramente que la Lip2 recombinante tiene una estabilidad mucho menor que la nativa, como se desprende del valor del término independiente, 90% para la nativa frente al 29% de la recombinante. En general las dos lipasas son más sensibles a valores altos de pH que de temperatura (a pHs alcalinos la actividad residual es baja) ya que en ambos casos los coeficientes del término de pH son mayores que el de temperatura, si bien con una ligera menor influencia en la recombinante. A diferencia de la nativa, en que existe el término cruzado (pH-Temperatura), éste no aparece en la ecuación de la lipasa recombinante, lo que puede indicar la poca importancia del efecto conjunto de ambas variables en su estabilidad.

El hecho de que la rLip2 sea mucho menos estable que la nativa conlleva una clara desventaja para su utilización como enzima en solución. Por este motivo se decidió

estudiar la obtención de un preparado enzimático inmovilizado que además de permitir la reutilización de la enzima pudiera conseguir aumentar su estabilidad.

5.6.- Inmovilización de Lip2.

Dados los resultados del estudio comparativo realizado entre la enzima nativa y recombinante, las pérdidas observadas en el proceso de liofilización (Tabla 5.5) y el considerable volumen que conlleva almacenar la enzima en solución, se procedió a la realización de ensayos de inmovilización de rLip2 utilizando como soporte un polímero de polipropileno, concretamente el EP100, con el objetivo de disponer de un preparado enzimático de mayor estabilidad y que facilite su recuperación en los medios de reacción. El soporte EP100 ya había demostrado ser el más eficiente en el estudio realizado para la inmovilización de la lipasa nativa de *Candida rugosa* (López *et al.*, 2002).

El EP100 es un soporte microporoso de polipropileno, suministrado por la casa AKZO Novel, The Netherlands, de naturaleza hidrofóbica y con una elevada área específica (Capellas *et al.*, 1996). Gitlesen *et al.*, (1997) ha considerado la adsorción de lipasas sobre este soporte como una interesante oportunidad para inmovilizar y purificar lipasas en un solo paso, ya que han observado como esta enzima, por sus características moleculares, se adsorbe selectivamente sobre el soporte hidrofóbico. En la tabla 5.9 se recogen algunas de las características del EP100 y se compara con otros tipos de soportes ensayos dentro del grupo de trabajo para la inmovilización de lipasas, en esta tabla se puede apreciar como el EP100 es el mejor entre los soportes indicados en términos de hidrofobicidad y de área específica.

Tabla 5.9. Características de distintos soportes utilizados en la inmovilización de lipasas.

Soporte	Proveedor	Tamaño de la Partícula (μm)	Diámetro de por (nm)	Área específica (m^2/g)	Agua (%)
EP100	Akzo	200-1000	1860	47	0.26
Celita 545	Fluka	26	17000	2.2	0.27
Poliamida 11	Merck	100-200	50	27	1.24
Duolite A568	Rohm & Haas	150-600	40	-	8.00

La técnica de inmovilización utilizada en nuestro caso ha sido la adsorción y las fuerzas de interacción dominantes entre las moléculas de lipasa y el soporte EP100 son de tipo

hidrofóbico. El protocolo de inmovilización seguido para los diferentes preparados lipásicos se han descrito en el apartado 4.8 de Materiales y Métodos.

Para obtener un biocatalizador adecuado para trabajar en reacciones de síntesis con la máxima productividad, se realizaron estudios de inmovilización con 100 mg de EP100 ofreciéndose diversas cargas enzimáticas. Aunque para distintas cargas la dinámica de la inmovilización fue distinta, se observó que para tiempos del orden de 30 horas en todos los casos el proceso de inmovilización se había completado casi en su totalidad.

En la figura 5.37 se presenta el porcentaje de inmovilización conseguido para las distintas cargas ensayadas. El porcentaje de inmovilización se calcula como la diferencia porcentual entre la actividad inicial (invariable para las condiciones de inmovilización utilizadas) y la actividad observada en el sobrenadante. Como se puede observar para actividades ofrecidas inferiores a 600 U/mL el porcentaje de inmovilización es alrededor del 90%, en cambio para actividades ofrecidas superiores baja considerablemente hasta llegar a valores del 19% para una actividad ofrecida del orden de 3000 U/mL.

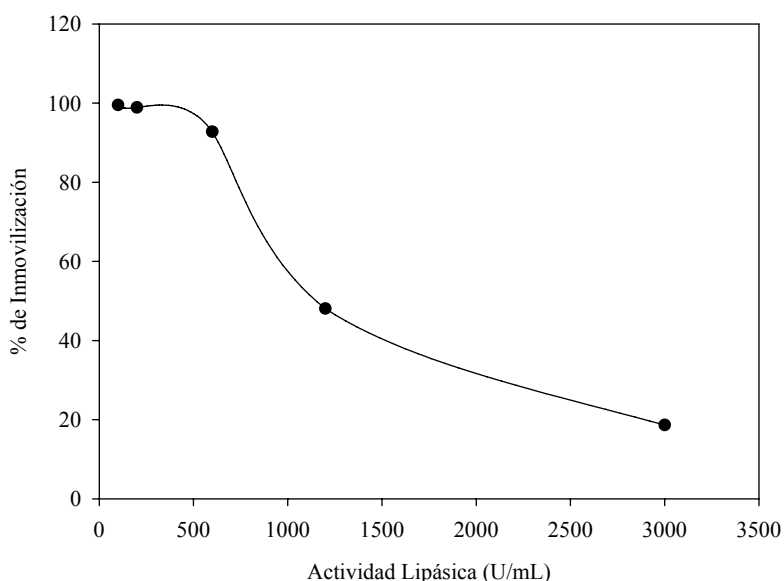


Figura 5.37.- Inmovilización porcentual sobre EP100 para distintas concentraciones de rLip2.

Así pues, para un mejor aprovechamiento del preparado enzimático, interesa trabajar a porcentajes de inmovilización elevados y la máxima carga enzimática posible, lo que en nuestro caso ocurre a una actividad ofrecida de 600 U/mL, que corresponde a un valor de 60 U/mg de EP100. Este valor se mantiene para cargas ofrecidas superiores indicando que corresponde al valor límite de rLip2 adsorbida sobre este soporte.

Puesto que el porcentaje de inmovilización se ha calculado por la diferencia de actividades enzimáticas entre la solución inicial y el sobrenadante a las 30 horas, se procedió a determinar la actividad del preparado inmovilizado.

Para el óptimo de carga determinada de 600 U/mL se determinó la actividad de la suspensión que contiene la enzima inmovilizada, a pesar de la dificultad de obtener una muestra homogénea, obteniéndose un 54% de actividad remanente. La pérdida de actividad observada puede atribuirse o bien a problemas difusionales o a inactivación de la enzima por el propio hecho de inmovilizarse, por ejemplo por una baja accesibilidad al centro activo. La existencia de posibles problemas difusionales se puede comprobar determinando la actividad remanente de cargas inferiores a la óptima, ya que a velocidades de reacción bajas la etapa de difusión deja de ser la limitante del proceso. Puesto que no se observa un aumento de la actividad remanente trabajando a cargas enzimáticas bajas, la pérdida de actividad debe atribuirse a problemas intrínsecos de la propia inmovilización de la rLip2.

El porcentaje de inmovilización de la rLip2 se comparó con los valores determinados con tres tipos de lipasas de *C. rugosa* de diferentes orígenes (López *et al.*, 2002): dos comerciales (Sigma y Amano), donde se encuentran presentes una mezcla de isoenzimas, mayoritariamente Lip1 y Lip3, y la enzima nativa de *C. rugosa* producida dentro del grupo de investigación que resultó ser una mezcla mayoritaria de las isoenzimas Lip2 y Lip3 (Tabla 5.10).

Tabla 5.10.- Comparación de inmovilización de lipasa de *Candida rugosa* de distintos orígenes

Biocatalizador	Unidades de actividad Inicial (U/mL)	% de inmovilización
Lipasa de <i>C. rugosa</i> Sigma	112.2	61.7
Lipasa de <i>C. rugosa</i> Amano	111.1	89.9
Lipasa de <i>C. rugosa</i> UAB	174	91.7
rLip2 de <i>C. rugosa</i> en <i>P. pastoris</i>	200	98.8

Se destaca que la rLip2 producida en *P. pastoris* presenta el mejor porcentaje de inmovilización. Estos resultados concuerdan con lo expuesto por López *et al.*, en 2002, pareciendo indicar que el perfil diferente de isoenzimas influye en el % de inmovilización siendo favorable para Lip2.

Tanto las lipasas comerciales, como la nativa han sido producidas en *C. rugosa*; no así la proteína heteróloga producida en *P. pastoris*. Cabe destacar que las diferencias en los niveles de glicosilación de las proteínas entre ambos microorganismos no han sido un obstáculo para la unión al soporte.

5.6.1.- Estudio de la estabilidad de rlip2 inmovilizada sobre EP100.

Para determinar la estabilidad del preparado inmovilizado de rLip2 frente a pH y temperatura se realizó un diseño de experimentos ortogonal de segundo orden siguiendo la misma metodología de la enzima en solución explicada en el apartado 5.5.6. La única diferencia fue que la actividad residual del preparado inmovilizado se determinó mediante el test de actividad lipásica Roche, debido a no disponer del equipo adecuado para realizar el test de actividad de la tributirina que se había realizado en el laboratorio de la Dra. Rúa.

Los resultados obtenidos a las diferentes condiciones, valores reales y normalizados, expresados como porcentaje de actividad referida al valor máximo alcanzado se presentan en la tabla 5.11.

Tabla 5.11.- Resumen de los datos obtenidos en el diseño de experimentos para determinar la estabilidad rLip2 inmovilizada frente a pH y temperatura.

Muestra	pH	pH normalizado	Temperatura ° C	Temperatura normalizado	Act. Lipasica U/mL	% de Actividad
1	5,0	-1.267	40,0	0	84.38	90,45
2	5,4	-1	32,1	-1	92.70	99,37
3	5,4	-1	47,9	1	93.29	100,00
4	7,0	0	30,0	-1.267	65.58	70,30
5	7,0	0	40,0	0	85.75	91,92
6	7,0	0	40,0	0	89.18	95,59
7	7,0	0	40,0	0	77.23	82,79
8	7,0	0	40,0	0	62.84	67,36
9	7,0	0	40,0	0	73.90	79,22
10	7,0	0	50,0	1.267	53.15	56,97
11	8,6	1	32,1	-1	76.06	81,53
12	8,6	1	47,9	1	39.54	42,38
13	9,0	1.267	40,0	0	42.09	45,11

A partir del valor del porcentaje de actividad residual de la rLip2 obtenido en el diseño de experimentos se obtuvo la siguiente ecuación empírica que describe el porcentaje de actividad residual de la lipasa recombinante inmovilizada

$$\% \text{ de actividad residual} = 73.54 - 7.68 \text{ pH} - 18.45 T - 9.94 \text{ pH } T$$

La superficie de respuesta obtenida, extrapolada hasta el valor de $\alpha = 1.5$ se presenta en la figura 5.38.

Es de destacar el considerable aumento en la estabilidad enzimática observado al compararla con la estabilidad enzimática de rLip2 en solución bajo las mismas condiciones, como se desprende del valor del término independiente de la ecuación. La tendencia observada de ser menos estable a temperaturas altas y pHs alcalinos se mantiene pero mucho más suavizada que en el anterior caso.

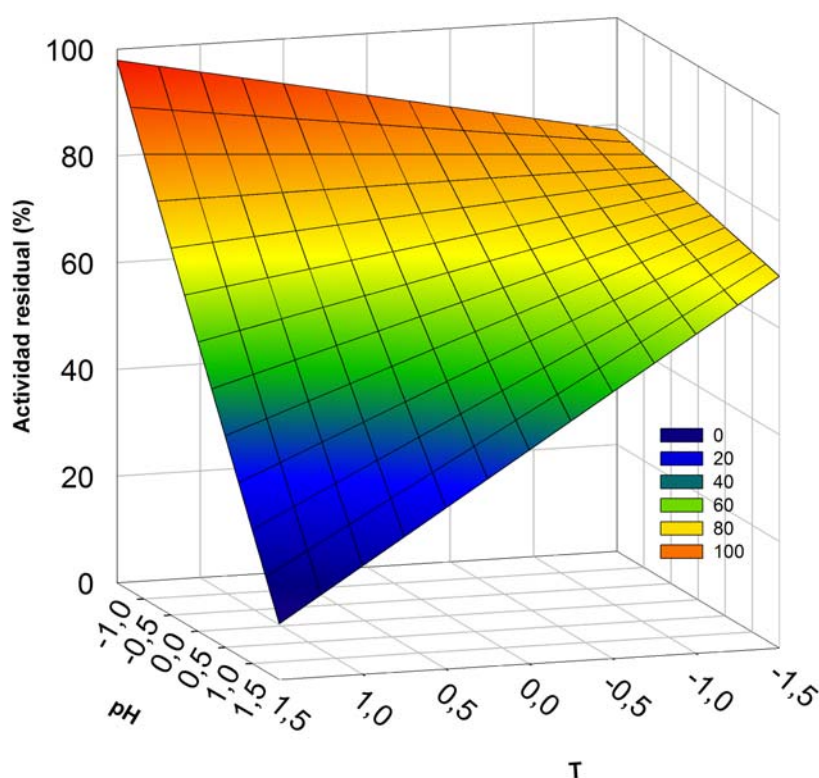


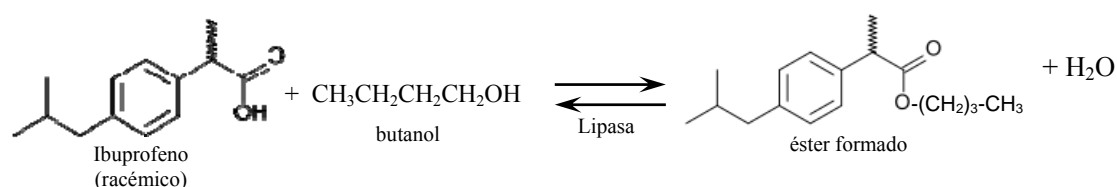
Fig. 5.38.- Superficie de respuesta expresada como actividad residual de rLip2 inmovilizada frente pH-Temperatura.

Como conclusión es evidente la mejora de la estabilidad por el hecho de inmovilizar la enzima recombinante lo que ha permitido obtener un preparado enzimático que puede ser probado en las reacciones de síntesis de alcoholes y ácidos quirales con la expectativa de que no pierda su actividad y que pueda ser reutilizable.

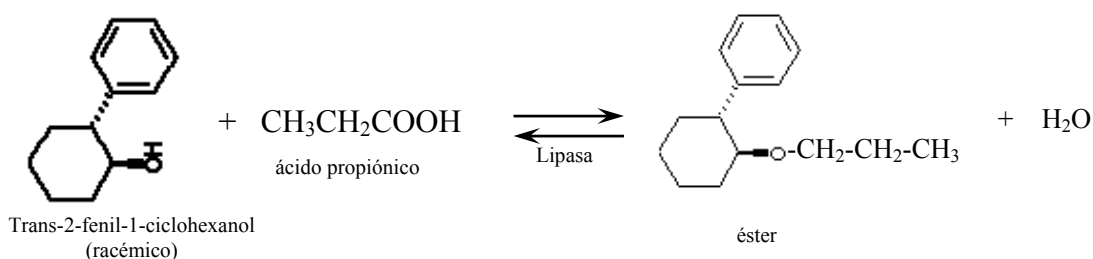
5.7.- Reacciones de síntesis de ésteres enantioméricos mediante rLip2.

Con la enzima rLip2 inmovilizada en EP100 y confirmada su estabilidad, se procedió a realizar la resolución enantioselectiva de la mezcla racémica tanto de ibuprofeno como de TPCH (Trans -2-fenil-1-ciclohexanol) mediante la síntesis de sus correspondientes ésteres. Estas reacciones fueron seleccionadas por conocerse su enantioselectividad utilizando la nLip2 (Lopez *et al.*, 2002). Se describen ambas reacciones en el esquema de la figura 5.39.

Se utilizó como biocatalizador 100 mg de EP100 al que se ofreció una actividad total de 3000 unidades. Por consiguiente, como con esta actividad ofrecida el porcentaje de inmovilización es del orden del 90%, las unidades de actividad por gramo de EP100 fueron aproximadamente 27000.



a



b

Fig.5.39.- Esquema de esterificación del Ibuprofeno (a) y del Trans -2-fenil-1-ciclohexanol (b).-

5.7.1.-Síntesis de los enantiómeros del ibuprofeno

En la Fig. 5.40 se observan los resultados obtenidos en la reacción de esterificación a partir de la mezcla racémica del ácido 2-(p-isobutilfenil) propiónico (ibuprofeno) utilizando como alcohol, n-butanol. Como era de esperar, rLip2 tiene preferencia por realizar la síntesis del éster del enantiómero S del ibuprofeno, sin detectar una disminución notable del enantiómero R (Sánchez, A. *et al.*, 2000^a). Se puede apreciar que a las 50 horas de reacción ya se consumido el 50% del ibuprofeno S inicial.

En la tabla 5.12, se realiza una comparación entre los resultados obtenidos con rLip2, y los correspondientes a nLip2 a tiempo final en términos de conversión, exceso enantiomérico y factor enantiomérico. Los valores de nLip2 han sido obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación (Lopez *et al.*, 2004). Cabe destacar, que si bien el análisis cromatográfico es capaz de separar los dos enantiómeros del ibuprofeno (reactivos), no distingue entre los dos posibles ésteres formados (productos). Por este motivo tal como se indica en materiales y métodos los cálculos de exceso enantiomérico se han realizado en base a los reactivos. Asimismo se normaliza el exceso enantiomérico calculado por su valor teórico máximo, obteniéndose el factor enantiomérico que, en este caso, es el parámetro que nos permite comparar las prestaciones enantioselectivas de los diferentes preparados.

De la tabla 5.12 se desprende que la rLip2 mejora la enantioselectividad obtenida por la nativa. Por otra parte, se ha detectado una recuperación de actividad de la rLip2, trascurrido el tiempo de reacción, de un 90% de actividad lipásica, con lo que su reutilización parece factible.

Así pues, la elevada actividad específica de este enzima recombinante y su facilidad de obtención comparándose con la lipasa nativa, hace de este catalizador un nuevo y efectivo preparado enzimático recombinante para la resolución del ibuprofeno y un excelente candidato para su utilización en biocatálisis con expectativas de éxito. No obstante, sería imprescindible realizar una optimización mayor del proceso de reacción en medio orgánico para encontrar las condiciones óptimas de operación con el objetivo de poder diseñar el futuro reactor enzimático.

Tabla 5.12.- Parámetros de enantioselectividad para diferentes lipasas inmovilizadas en la esterificación del ibuprofeno.

Lipasas	X%	EE%	EF%
nLip2	41	56	80
rLip2	44	74	96

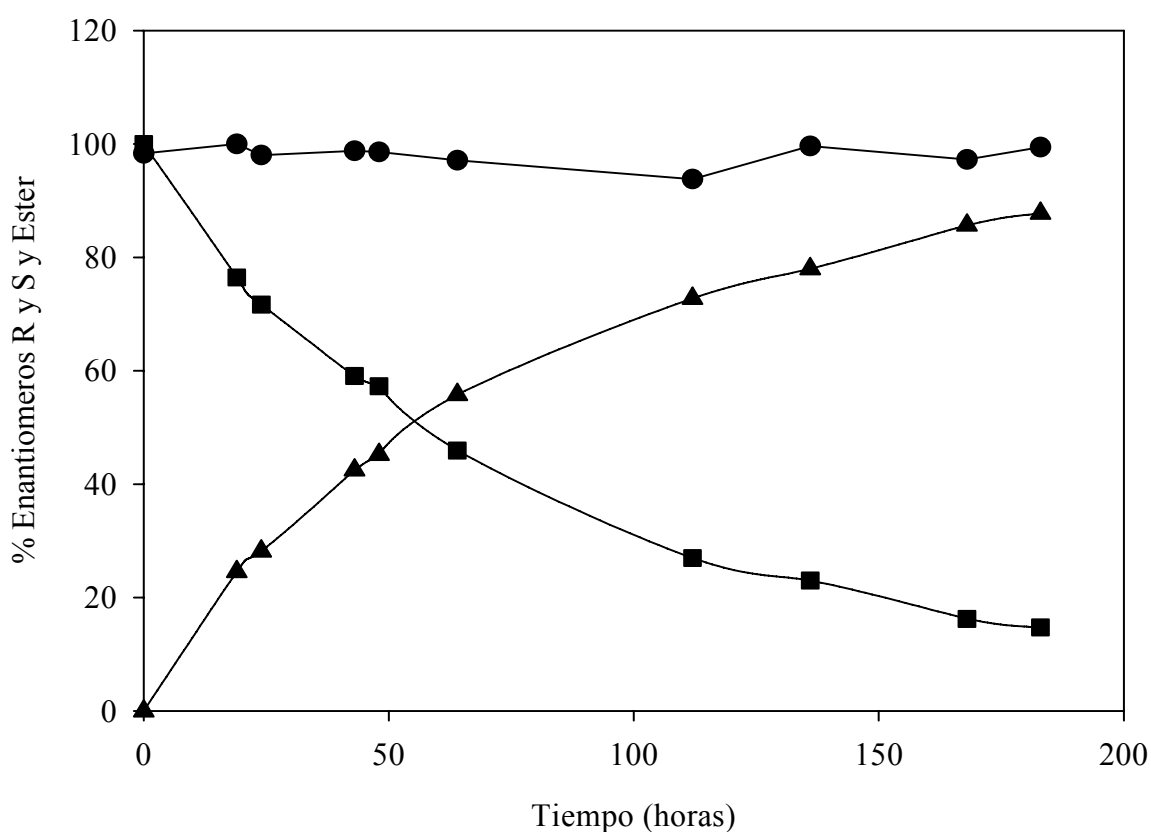


Fig. 5.40.- Evolución de los enantiómeros del ibuprofeno por acción de la rLip2 en el proceso de síntesis enantioselectiva. ■ % de enantiómero S, ▲ % de ester y ● % de enantiómero R.

5.7.2.- Síntesis de los enantiómeros de TPCH

En este caso la reacción tiene lugar entre el alcohol enantiomérico (TPCH) y el ácido propiónico y el análisis cromatográfico, como en el caso del ibuprofeno, no distingue los dos posibles ésteres formados (Sánchez, A. *et al.*, 2000^b).

Los datos obtenidos muestran velocidades de reacción muy bajas, y sólo se obtuvo una conversión de alrededor del 20% después de 480 horas de reacción tal como se observa en la Fig. 5.41, aunque la selectividad fue prácticamente del 100% por el enantiómero S. Con la nlip2 la conversión final conseguida fue del 34% siendo la velocidad inicial de reacción superior (Lopez *et al.*, 2004). Por consiguiente, si bien el comportamiento cualitativo de ambas lipasas fue similar, desde el punto de vista cuantitativo las prestaciones de la rLip2 fueron inferiores en la síntesis quiral del TPCH.

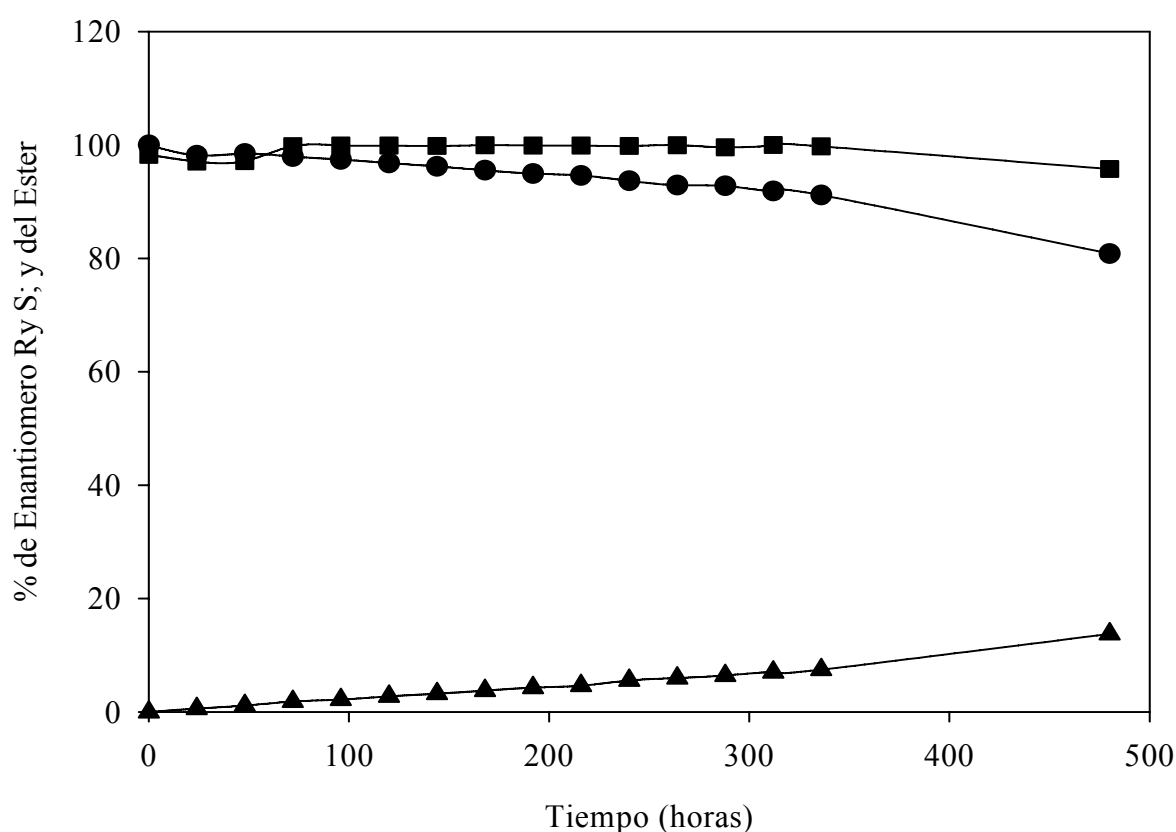


Fig. 5.41.- Evolución de los enantiómeros de TPCH por acción de la rLip2 en el proceso de síntesis enantioselectiva. ■ % de enantiómero S, ▲ % de ester y ● % de enantiómero R.

6.-Conclusiones

6.1-Conclusión global

Como conclusión global es de reseñar que se ha conseguido obtener la isoenzima Lip2 de *C. rugosa* expresada en *P. pastoris*, alcanzándose una producción 10 veces superior a la mejor producción obtenida con el microorganismo nativo. Además, se ha demostrado que el enzima recombinante tiene una capacidad biocatalítica comparable a la Lip2 nativa en la resolución de la mezcla racémica de ibuprofeno. Este hecho, conjuntamente con su relativamente fácil proceso de recuperación hace de este nuevo catalizador un excelente candidato para su utilización en biocatálisis con expectativas de éxito.

6.2.-Conclusiones parciales:

- 1) Se ha realizado con éxito el diseño y síntesis del gen *rlip2*, así como la expresión heteróloga del mismo en *P. pastoris*, permitiendo la posterior obtención de un enzima recombinante funcional.
- 2) Se ha clonado el gen *lip2*, sintetizado *in vitro*, al vector de expresión pPICZ α bajo el control del promotor AOX, inducible por metanol, generando el vector pPICZ α *rlip2*, el cual se ha transformado de manera estable en *P. pastoris*. La selección de clones transformantes productores de rLip2 en matraces Erlenmeyers fue positiva, permitiendo seleccionar cepas productoras de lipasa activa para la producción de rLip2 a escala de bioreactor (5L).
- 3) Se ha determinado el pH óptimo de la fermentación en cultivos discontinuos en bioreactor; su valor óptimo fue 6.5. A pH inferiores se obtuvieron producciones menores y a pH superiores existen problemas operacionales de precipitación de alguno de los componentes del medio de cultivo.
- 4) La selección de una estrategia de operación en discontinuo alimentado a elevadas densidades celulares con base a las condiciones de pH óptimas anteriormente determinadas permitió obtener agregados de rLip2 sin actividad lipásica.
- 5) La causa de la formación de estos agregados sin actividad lipásica fue la elevada fuerza iónica del medio de fermentación.

- 6) Un posterior proceso de ultra y diafiltración permitió recuperar la actividad lipásica, obteniéndose valores de actividad 10 veces superiores a los obtenidos con la levadura nativa en bioprocesos discontinuos alimentados.
- 7) El proceso de liofilización, a diferencia de la Lip2 nativa, presentó una pérdida de actividad del orden del 98%, la liofilización conjunta con aditivos solo permitió recuperar un 25% de la actividad.
- 8) Se realizó una caracterización bioquímica parcial de la rLip2.
- 9) Por lo que respecta a su caracterización funcional se determinó el pH y la temperatura óptima de trabajo de la rLip2. Así mismo, se estableció su especificidad frente a p-nitrofenoles y triglicéridos, y el efecto del almacenamiento de la misma sobre la actividad lipásica.
- 10) Se realizó un estudio comparativo de estabilidad en solución entre la Lip2 nativa y recombinante, demostrándose ser mucho más estable la nativa.
- 11) La inmovilización por adsorción sobre EP100 permitió obtener un preparado inmovilizado que permitía su reutilización en biocatálisis, y además aumentaba considerablemente su estabilidad, siendo comparable a la nativa en solución.
- 12) Su aplicación en biocatálisis en reacciones de síntesis en medio orgánico para la obtención de productos enantioméricamente puros resultó óptima en el caso del ibuprofeno, un antiinflamatorio no esterooidal de uso cotidiano.

7.-Bibliografía

7.1- Referencias

1. Aires-Barros, M.R., Taipa, M.A. & J.M.S. (1994). Isolation and purification of lipases. In "Lipases: their structure, biochemistry and application". Eds. Woolley, P. & Petersen, S.B. pp 243-270. Cambridge. University Press.
2. Akhnazarova, S., (1982). Kazarov, V.; Experimental optimisation in Chemistry and Chemical Engineering, MIR Publishing Moscow.
3. Alberghina, L. & Lotti, M. (1997). Cloning, sequencing and expression of *C. rugosa* lipases. *Methods Enzymol.* 284:246-260.
4. Allenmark, S. & Ohlsson, A. (1992). Studies of the heterogeneity of a *Candida cylindracea* (*rugosa*) lipase: Monitoring of esterolytic activity and enantioselectivity by chiral liquid chromatography. *Biocatalysis.* 6:211-221.
5. Baer J.W., Gerhartz B., Hoffmann T., Rosche F., Demuth H-U. (2003). Characterization of human dp iv produced by a *Pichia pastoris* expression system. *Dipend. Amin. In Health and Disease* 103-108.
6. Balcao, M., Paiva A. & Malcata F.(1996). Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme Microb Technol* 18: 392-416.
7. Biemans R., Gregoire D., Haumont M., Bosseloir A., Garcia L., Jacquet A., Dubeaux C., Bollen, A. 1998. The conformation of purified Toxoplasma gondii SAG1 antigen, secreted from engineered *Pichia pastoris*, is adequate for serorecognition and cell proliferation. *J. Biotechnol.* 66: 137-146.
8. Borgström, B. & Brocman, H.L. (1984). Lipases. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.
9. Boyle, S., Popp, M., Smith, W., Greenberg, R., James, M., (1998). *Marine Environ. Res.* 46 (1-5):25-28.
10. Brahim-Horn, M., Guglielmino, M.L., Elling, L., & Sparrow, L.G. (1990). The esterase profile of a lipase from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1042:51-54.
11. Brocca, S., Grandori, R., Breviario, D. & Lotti, M., (1995). Localization of lipase genes on *Candida rugosa* chromosomes. *Curr. Genet.* 28:454-457.
12. Brocca S., Schmidt-Danner C., Lotti M., Alberghina L., Schmid R.D. (1998); Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase; *Protein Sci.*, 1998 Jun, 7 (6):1415-1422.
13. Capellas, M., Benaiges, M.D., Caminal, G., González, G., López-Santín, J., Clapés,

- P. (1996). Influence of water activity and support material on the enzymatic synthesis of a CCK-8 tripeptide fragment. *Biocatal. Biotransfor.* 13, 165-178.
14. Cereghino, J.L. & Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 24 (1):45-66.
15. Chang, R.C., Chou, S.J. & Shaw, J.F. (1994). Multiple forms and functions of lipase *Candida rugosa*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 19, 93-97.
16. Chang, S.W., Lee, G.C., Shaw, J.F., (2006). Efficient production of active recombinant *Candida rugosa* LIP3 lipase in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified enzyme. *J. Agric. Food Chem.* Aug 9;54 (16):5831-8.
17. Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G. and Sih, C.J. (1982). Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7294-7299.
18. Choi, B.-K., Jimenez-Flores, R. (1996) Study of putative glycosylation site in bovine beta-casein introduced by PCR-based site-directed mutagenesis. *J. Agric. Food.* 44: 358-364.
19. Clare J.J., Rayment F.B., Ballantine S.P., Srekrishna K., Romanos, M.A. (1991). High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotech.* 9: 455-460.
20. Cos, O., (2005). Monitorizació i control del procés de producció de proteïnes heterologues en el llevat metilotròfic *Pichia pastoris*. Tesis doctoral Universitat Autònoma de Barcelona, 324
21. Cregg, J.M., Barringer K.J., Hessler A, Maden K.R.(1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* (5):3376-3385.
22. Cregg, J.M., Tschopp, J.F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W.S., Buckholz, R.G., Madden, K.R., Kellaris, P.A., Davis, G.R., Smiley, B.L., Cruze, J., Torregossa, R., Velicelebi, G. & Thill, G.P. (1987). High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5, 479-485.
23. Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K. J., Thill, G.P. & Stillman, C.A.(1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1316-1323.

24. Cregg, J.M. & Madden, K.R. (1987). Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* by gene disruption. ^{In} "Biological Research on Industrial Yeasts" (G.G. Stewart, I. Russell, R.D. Klein, and R.R. Hiebsch, Eds.), Vol. II, pp. 1-18. CRC Press, Boca Raton, FL.
25. Cregg J.M., Vedvick T.S., and WC. Rasehke. (1993). Recent advantages in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 11:905-910.
26. Crueger, W. & Crueger, A. (1993). *Biotechnología: Manual de microbiología industrial*; Editorial Acribia, S.A.: 413.
27. D`Anjou, M., C., Daugulis A., J., (2001) A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotech. Bioengin.* 72 (1) :1-11.
28. Dandavate, V., Madamwar, D., (2008). Reusability of Surfactant-coated *Candida rugosa* Lipase Immobilized in Gelatin Microemulsion-based Organogels for Ethyl Isovalerate Synthesis. *J Microbiol Biotechnol.* Apr;18(4):735-41.
29. Dalmau, E., Sánchez, A., Montesinos, J., L., Valero, F., Lafuente, F., J., & Casas, C., (1998). Study of the drop size frequencies in a microbiol growth system with an aqueous-organic culture medium: lipase production from *Candida rugosa*. *J. Biotechnology* 59: 183-192.
30. Danty E., Briand L., Michard-Vanhee C., Perez V., Arnold G., Gaudemer O., Huet D., Huet J.C., Ouali C., Masson C., Pernollet J.C. (1999). Cloning and expression of a queen pheromone-binding protein in the honeybee: an olfactory-specific, developmentally regulated protein. *J. Neurosci.* 19(17): 7468-75.
31. Del Río, J. L., Serra, P., Valero, F., Poch, M. and Soà, C., (1990). Reaction Échème of Lipase production by *Candida rugosa* growing on olive oil, *Biotechnology Letter.* **12**, 11, 835-838.
32. Desnuelle, P., Sarda, L., & Ailhaud, G., (1960) Inhibition de la Lipase pancreatique par la diethyl-p-nitrophenyl phosphate en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta.* 37:570-571.
33. Deutscher, M.P., (1990). "Guide to protein purification. *Methods in enzymology*". pp 182. Academic Press inc., San Diego.
34. Diczfalusy, M.A., Hellman, U. & Alexson, S.E.H. (1997). Isolation of carboxylester lipase (CEL) isoenzymes from *Candida rugosa* and identification of the

- corresponding genes. *Archiv. Biochem. Biophys.* 348 (1):1-8.
35. Dünhaupt, A., Lang, S. & Wagner, F. (1992). *Pseudomonas cepacia* lipase: studies on aggregation, purification and on the cleavage of olive oil. *Biotechnol. Lett.* 14 (10):953-958.
36. Fahnestock, S.R., Bedzyk, L.A. (1997). Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 33-39.
37. Ferrer, F., Montesinos, J.L., Valero, F., & Solà, C. (2001). Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa* : A. review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95:221-255.
38. Ferrato, F., Carriere, F., Sarda, L. & Verger, R. (1997). A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. In "Methods in Enzymology". 286, part B. Eds. Rubin, B. and Dennis, E.A. 327-347. Academic Press. San Diego.
39. Fu, Y., Ibrahim, A.S., Fonzi, W., Zhou, X., Ramos, C. F. & Ghannoum, M.A. (1997). *Microbiology* 143:331-340.
40. Gellissen G 2000 Heterologous protein production in methylotrophic yeasts *Appl Microbiol Biotechnol.* Dec;54(6):741-50.
41. Gil N., Bosch M. P., Guerrero A. (1997). Chemoenzymatic Synthesis of (R)-(+)- α -(4-Fluorophenyl)-4(2-pyrimidinyl)-1-piperaziebutanol and (R)-(+)- α -(4-Fluorophenyl)-4-methyl-1-piperaziebutanol as Potencial Antipsychotic Agents. *Tetrahedron* 53(44): 15115-15122.
42. Gitlensen , T., Bauer, M., and Adlercreutz, P. (1997). Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochim. Biophys. Acta.* (1345),2,188-196.
43. Godia, F. & Santín, J. (1998). *Ingeniería Bioquímica*. Editorial Síntesis: 350.
44. Gordillo, M.A., N. Obradors, J.L. Montesinos, F. Valero, J. Lafuente and C. Solà. (1995). Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa* *Appl., Microbiol. Biotechnol.* 43, 38-41.
45. Gordillo, M. A., Sanz, A., Valero, F., Montesinos, J.L., Lafuente, J. & Solà, C. (1998). Enhancement of *Candida rugosa* lipase production by using different control fed-batch operational strategies. *Biotechnol. Bioeng.* 60 (2):156-168.
46. Goodman J.M. (1985). Dihydroxyacetone synthase is an abundant constituent of the methanol-induced peroxisome of *Candida boidinii*. *Biol Chem.* 260(11): 7108-13.

47. Guo R, Ding M, Zhang S, Xu G, Zhao F., (2008) Expression and characterization of two secreted His6-tagged endo-beta-1,4-glucanases from the mollusc *Ampullaria crosseana* in *Pichia pastoris*. *Acta Biochim Biophys Sin* 40(5):419-25.
48. Graupner, M., Haalck, L., Spener, F., Lindner, H., Glattewr, O., Paltauf, F. & Hermetter, A. (1999). Molecular dynamics of microbial lipases as determined from their intrinsic tryptophan fluorescence. *Biophys. J.* 77 (1): 493-504.
49. Griffiths, A., Gelbart, W., Miller, J., Lewontin, R. (2000). *Genética moderna*. McGraw-Hill Interamericana: 676.
50. Harder W., Veenhuis M. (1989). Metabolism of one-carbon compounds. In: A.H. Rose, J.S. Harrison (Eds.), *The Yeast* 3: 289-316.
51. Hasslacher M., Schall M., Hayn M., Bona R., Rumbold K., Luckl J., Griengl H., Kohlwein S.D., Schwab H. (1997). High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr. Purif.* 11: 61-71.
52. Hedrich, H.C., Isobe, K. & Stahl, B.S. (1993). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption-ionization mass spectrometry applied to multiple forms of lipases. *Anal. Biochem.* 211, 288-292.
53. Hilario E., Lataro R.C., Alegria M.C., Lavarda S.C.S., Ferro J.A., Bertolini, M.C. (2001). High-level production of functional muscle α -tropomyosin in *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 284: 955-960.
54. Higgins, D. R. & Cregg, J. M., (1998). *Pichia* Protocols. nº 103 in *Methods in Molecular Biology*: 270 pp.
55. Holmquist M., Tessier D., Cygler M.; (1997) High-level production of recombinant *Geotrichum candidum* lipases in yeast *Pichia pastoris*; *Protein Expr. Purif.*; Oct; 11(1):35-40.
56. Holwerda, K., Verdake, P., E., & de Willigen, A., H., A., (1936) Vergleichende untersuchungen über die verseifungsgeschwindigkeit einiger einsäuriger triglyceride unter einfluss von pankreasextrakt. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.* 55:43-57.
57. Huang W. C. Wang Ai-Yu., Wang Li-T., Sung, H.Y. (2003). Expression and characterization of sweet potato invertase in *Pichia pastoris*. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1494-1499.
58. Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Van Heuvel, M. & Misset, O. (1994). Bacterial Lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 29-63.

59. Kaiser, R., Erman, M., Duax, W.L., Ghosh, D. & Jörnvall, H. (1994). Monomeric and dimeric forms of cholesterol esterase from *Candida cylindracea*. Primary structure, identity in peptide patterns and additional microheterogeneity. FEBS Lett. 337:123-127.
60. Kakugawa K., Shobayashi M., Suzuki O., Miyakawa T. (2002). Cloning, characterization, and expression of cDNA encoding a lipase from *Kurtzmanomyces* sp. I-11. Bisci. Biotechnol. Biochem. 66(6): 1328-1336.
61. Kawaguchi, Y., Honda, H., Taniguchi-Morimura, J. & Iwasaki, S. (1989). The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. Nature. 341:164-166.
62. Kawaguchi, Y. & Honda, H. (1991). The structure of lipase genes and pseudogenes of *Candida cylindracea*. In: "Lipases: Structure, Mechanis and Genetic Engineering". Eds.: Alberghina, L., Schimd, R.D. & Verger, R. GBF Monographs 16 VCH Verlag, Weinheim, pp.222-230.
63. Kwon, S.J., Song, K.M., Hong, W.H. and Rhee, J.S. (1995). Removal of water produced from lipase-catalyzed esterification in organic solvent by pervaporation. Biotechnol. Bioeng. 46, 1-12.
64. Kreilgaard, L., Frokjaer, S., Flink, J., Randonph, T. & Carpenter, J. (1998). Effects of Additives on the Staility of Recombinant Human Factor XIII during Freeze-Drying and Storage in the Dried Solid. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 360, N11, 121-134 pp.
65. Lee, G-C., Tang, S-J., Sun, K-H. & Shaw, J-F (1999). Analysis of the gene family encoding lipases in *Candida rugosa* by competitive reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microb. 65 (9):3888-3895.
66. Lee, G.C., Lee, L.C., Sava, V.& Shaw, J.F. (2002). Multiple mutagenesis nonuniversal serine codons of *Candida rugosa* LIP2 gene and the biochemical characterization of the purified recombinant LIP2 lipase overexpressed in *Pichia Pastoris*. Biochem. J. 366:1-29 pp.
67. Lee, SH., Park, OJ., Uh, HS., (2008) A chemoenzymatic approach to the synthesis of enantiomerically pure (S)-3-hydroxy-gamma-butyrolactone. Appl Microbiol Biotechnol. 2008 May 1
68. Lehninger. Principios de bioquímica. (2001). David L. Nelson; Michael M. Cox (Ediciones Omega) 1264 p.

69. Lesuisse, E., Schanck, K. & Colson, C. (1993). Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 216:155-160.
70. Levandoski M., Caffery P., Rogowski R., Lin Y., Shi Q-L., Hawrot E. (2000). Recombinant expression of α -bungarotoxin in *Pichia pastoris* facilitates identification of mutant toxins engineered to recognize neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* 74(3): 1279-1289.
71. Lin Cereghino G.P., Lin Cereghino J., Ilgen C., Cregg J.M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current opinion in Biotech.* 13:329-332.
72. Longhi, S., Fusetti, F., Grandori, R., Lotti, M., Vanoni, M. & Alberghina, L. (1992). Cloning and nucleotide sequences of two lipase genes from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys. Acta* 1131: 227-232.
73. López-Belmonte, M.T., Alcántara, A. R. and Sinisterra, J.V. (1997). Enantioselective esterification of 2-aryl propionic acids catalyzed by immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *J. Org. Chem.* 62, 1831-1840.
74. López, C., Guerra, N.P. & Rúa M.L. (2000). Purification and characterization of two isoforms from *Candida rugosa* lipase B. *Biotechnol. Lett.* 22:1291-1294.
75. López, N. (2001). Immobilizació de diferents lipàsics *Candida rugosa* i aplicació en la resolució de compostos quirals d'interés farmaucèutic. Utilització dels isoenzims Lip1, Lip2 i Lip3 purs. Màster Universitario. Universitat autònoma de Barcelona. Bellaterra: 104.
76. López, N., Pérez, R., Vázquez, F., Valero, F., Sánchez, A. (2002). Immobilisation of different *Candida rugosa* lipases by adsorption onto polypropylene powder: application to chiral synthesis of ibuprofen and *trans*-phenyl-1-cyclohexanol esters. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 77: 175-182
77. López, N., Pernas, M., Pastrana, L., Sánchez, A., Valero, F. and Rúa, M.L. (2004) "Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2 and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media". *Biotechnology Progress*. Vol 20: 65-73.
78. Lotti, M., Grandori, R., Fusetti, F., Longhi, S., Brocca, S., Tramontano, A. & Alberghina, L. (1993). Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. *Gene.* 124:45-55

79. Lotti, M., Brocca, S., Fusetti, F. & Alberghina, L. (1994^a). Expression of recombinant lipase *Candida rugosa*. Med. Fac. Landbouwn. Univ. Gent. 59(4):2313-2319.
80. Lotti, M., Tramontano, A., Longhi, S., Fusetti, F., Brocca, S., Pizzi, E. & Alberghina, L (1994^b). Variability within the *Candida rugosa* lipases family. Prot. Eng. 7:531-535.
81. Lotti, M. & Alberghina, L. (1996). *Candida rugosa* lipase isoenzymes. ^{In} "Enginnering of lipases". Ed. Malcata, F.X., 1st Edition. pp. 115-124. Kluwer Academic Publishers. Dordrecat, The Neherlands.
82. Macrae, A.R. (1983). ^{In} : "Microbial enzymes and technology". Ed. Fogarty, W.M. Applied Science, London. 225-250 pp.
83. Macrae, A.R. & Hammond, R.C. (1985). Present and future applications so lipases. Biotech. Gen. Engin. Rev. 3:193-217.
84. Mancheño, J., M., Pernas, M., A., Rúa, M., L., & Hermoso, J., A. (2003) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of two different crystal forms of the lipase 2 isoform from the yeast *Candida rugosa*. Acta Crystallografica, D59, 499-501.
85. Mertens J., Shiraishi N., Campbell, W. (2000). Recombinant expresión of molybdenum reductase reagements of plant nitrate reductase at high levels in *Pichia pastoris*. Plant Physiol. 123(2): 743-756.
86. Mileto, D., Brocca, S., Lotti, M., Takagi, M., Alquati, C. & Alberghina, L. (1998). Characterization of the *Candida rugosa* lipase system and overexpression of the Lip 1 isoenzyme in a non-conventional yeast. Chem. Phys. Lipids. 93 (1-2):47-55.
87. Minning S., Schmidt-dannert C., R.D. Schmid. (1998). Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. J. Biotechnology. 66:147-156.
88. Mokelainen M., Tu H., Vuorela A., Notbohm H., Kivirkko K. I., Myllyharju J. (2001). High-level production of human type I collagen in the yeast *Pichia pastoris*. Yeast. 18:797-806.
89. Montesinos, J.L., Obradors, N., Gordillo, M.A., Valero, F., Lafuente, J., & Sola, C. (1996). Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. Appl. Biochem. Biotechnol. 59: 25-37.
90. Montesino R., Garcia R., Quintero O., Cremata J.A. (1998). Variation in N-linked

- oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Protein Expr. Purif. 14: 197-207.
91. Muderhwa, J.M.& Brockman, H.L. (1992). Lateral lipid distribution is a major regulator of lipase activity. Implications for lipid-mediated signal transduction. J. Biol. Chem. 267: 24184-24192.
 92. Obradors, N., Montesions, J.L., Valero, F., Lafuente, J. and Solà, C. (1993). Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. Biotechnol. Lett. 15, 4, 357-360.
 93. Ogata, K., Nishikawa, H. & Ohsugi, M. (1969). A yeast capable of utilizing methanol. Agric. Biol. Chem. 33: 1519-1520.
 94. Oka C., Tanaka M., Muraki M., Harata K., Suzuki K., Jigami Y. (1999). Human lysozyme secretion increased by alpha-factor pro-sequence in *Pichia pastoris*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(11): 1977-1983.
 95. Cos, O., Ramon, R., Montesinos, J., L., Valero F., (2006) A Simple Model-Based Control for *Pichia pastoris* Allows a More Efficient Heterologous Protein Production Bioprocess, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 95, 1, 145-154
 96. Pernas, M.A., Lopez, C., Pastrana, L. & Rúa, M.L. (2000). Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. J. Biotechnol. 84:163-174.
 97. Pernas, M.A. Lopez C, Pastrana L, Rúa ML. (2001). Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. J Biotechnol. 2001 Nov 30;84 (2):163-74.
 98. Pernas, M. (2003). Purificación y caracterización cinética y molecular de lipasa de *Candida rugosa*. Tesis doctoral Universidade de Vigo. 189.
 99. Pesole, G., Lotti, M., Alberghina, L. & Saccone, C. (1995). Evolutionary origin of nonuniversal CUGSer codon in some *Candida* species as inferred from a molecular phylogeny. Genetics. 141 (3):903-907.
 100. Pierce Chemical Company. (1989). "Coomassie Protein Assay Reagent Kit"
 101. Rai, M., Padh, H. 2001. Expression systems for production of heterologous proteins. Current Science 801121-1128.
 102. Rapp, P. & Backhaus, S. (1992). Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. Enzyme Microb. Technol. 14: 938-943.
 103. Ree R., Van Leeuwen A., Bulder I., Bonc J., Aalberse R. (1999). Purified natural

- and recombinant Fel d 1 and cat albumin in in Vitro diagnostics for cat allergy. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 104(6): 1223-1229.
104. Rodriguez E., Han Y., Lei, X. G. (1999). Cloning, sequencing, and expresión o fan Escherichia coli acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 117-123
105. Romanos M.A., Clare J.J., Beesley K.M., Rayment F.B., Ballantine S.P., Makoff A.J., Dougan G., Fairweather N.F., Charles I.G. (1991). Recombinant Bordetella pertussis pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine* 9: 901-906.
106. Rose, A. H., Harrison, J.S. (1989). *The yeast*. Academic Press, New York.
107. Rossanese O. W., Soderholm J., Besi B. J., Sears I. B., O'Connor J., Williamson E. K., Glick B.S. (1999). Golgi Structure correlates with transitional endoplasmatic reticulum organization in *Pichi pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol*, 145: 69-81.
108. Rúa, M.L., Díaz-Mauriño, T., Otero, C. & Ballesteros, A. (1992). Isoenzymes of lipase from *Candida cylindracea*. Studies related to carbohydrate composition. *Annals of the New York. Academy of Sciences.* 672:20-23.
109. Rúa, M.L., Días-Mauriño, T., Fernández, V.M., Otero, C. & Ballesteros, A. (1993). Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1156:181-189.
110. Rúa, M.L. & Ballesteros, A. (1994). Rapid purification of two lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnol. Tech.* 8:21-26.
111. Rúa, M.L., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A. & Schmid, R.D. (1997). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *J. Biotechnol.* 56: 89-102.
112. Sambrok, J., Frithch, E.F., Maniatis, T. (1992). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press (3 vol.)
113. Sánchez, A. (1998). Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa* aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona: 281.
114. Sánchez, A., Gordillo A. M., Montesinos J.L., Valero F., Lafuente J., (1999). On-

- line determination of the total lipolytic activity in a four-phase system using a lipase adsorption. *J. Biosci. Bioeng.* 87(4):500-506.
115. Sánchez, A., Valero, F., Lafuente, J., & Solà, C. (2000^a). Highly enantioselective esterification of racemic ibuprofeno in a packed bed reactor using immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *Enzyme Microb. Technology.* 27:157-166.
116. Sánchez^b, A., del Río, J.L., Valero, F., Lafuente, J., Faus, I. & Solà, C. (2000^b). Continuous enantioselective esterification of trans-2-phenyl-cyclohexanol using a new *Candida rugosa* lipase in a packed bed reactor. *J. Biotechnol.* 84: 1-12.
117. Sarda, L. & Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta.* 30: 513-521.
118. Schønheyder, F. & Volqvartz, K. (1945). On the affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution. *Acta Physiol. Scand.* 9: 57-67.
119. Scorer C.A., Buckholz R.G., Clare J.J., Romanos M.A. (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136: 111-119.
120. Serrano, A. (1998). Estudio y modificación de la glicosilación de las lipasas producidas por la levadura *Candida rugosa*. Máster Universitario. Universitat autònoma de Barcelona. Bellaterra.
121. Shaw, J.F., Chang, C.H. & Wang, Y.J. (1989). Characterization of three distinct forms of lipolytic enzyme in a commercial *Candida* lipase preparation. *Biotechnol. Lett.* 11:779-784.
122. Sidebottom, C.M., Charton, E., Dunn, P.P.J., Mycock, G., Davies, C., Sutton, J.L., Macrae, A.R. and Slabas, A.R. (1991). *Geotrichum candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities. *Eur. J. Biochem.* 202, 485-491.
123. Skupin, R., Cooper, T.G., Frohlich, R., Prigge, J. and Haufe, G. (1997). Lipase-catalyzed resolution of both enantiomers of Ornidazole and some analogues. *Tetrahedron: Asymmetry.* 8, 14, 2453-2464.
124. Smaby, J.M., Muderhwa, J.M. & Brockman, H.L. (1994). Is lateral phase separation required for fatty acid to stimulate lipases in a phosphatidylcholine interface?. *Biochemistry.* 33: 1915-1922.
125. Small, D.M. (1968). A classification of biologic based upon their interaction in aqueous systems. *J. Am Oil. Chem. Soc.* 45 (3): 108-19.

126. Solà, A., Jouhten, P., Maaheimo, H., Sánchez-Ferrando F., Szyperski, T., and Ferrer, P., (2007) Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol/methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates. *Microbiology* (2007), 153, 281–290
127. Sreekrishna K., Nelles L., Potenz R., Cruze J., Mazzaferro P., Fish W., Fuke M., Holden K., Phelps D., Wood P., Parker, K. (1989). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris*. *Biochemistry* 28: 4117-4125.
128. Stuer, W., Jaeger, K.E. & Winkler, U.K.(1986). Purification of extraellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* 168 (3): 1070-1074.
129. Subramani S. (1998). Components involved in Peroxisome Import, Biogenesis, Proliferation, Turnover, and Movement. *Physiological reviews* 78 (1): 171-188.
130. Sztajer, H., Lünsdorf, H., Erdmann, H., Menge, U. & Schmid, R., (1992). Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1124:253-261.
131. Taipa, M.A., Liebeton, K., Costa, J.V., Cabral, J.M.S. & Jaeger, K-E. (1995). Lipase from *Chromobacterium viscosum*: biochemical characterization indicating homology to the lipase from *Pseudomonas glumae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1256:396-402.
132. Tang, S-J., Sun, K-H., Sun, G-H., Chang, T-Y. & Lee, G-C.(2000). Recombinant expression of the *Candida rugosa* lip4 lipase in *Escherichia coli*. *Protein Express. Purifl.* 20: 308-313.
133. Tang, S-J., Shaw, J-F., Sun, K-H., Sun, G-H., Chang, T-Y., Lin, C-K., Lo, Y-C. & Lee, G-C. (2001). Recombinant expression and characterization of the *Candida rugosa* lip4 lipase in *Pichia pastoris*: Comparison of glycosylation, activity, and stability. *Arch. Biochem. Biophys.* 387 (1): 93-98 pp.
134. Tarentino, A.L., Gomez, C.M. & Plummer, T. H. Jr. (1985). Deglycosylation of asparaginyl-linked glycans by peptide: N-Glycosidase F. *Biochem.* 24: 4664-4671.
135. Tomizuka, N., Ota, Y.& Yamada, K.,(1966). Studies on lipase from *Candida cylindracea*. Part I. Purification and properties. *Agric. Biol. Chem.* 30 (6), 576-584.
136. Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A. & Gingeras T.R. (1987). Expression of Lac Z gene from two methanol regulated promoters in *Pichia pastoris*.

- Nucleic Acid Res. 15:3859-3876.
137. Valero, F., Poch, M., Solá, C., Santos Lapa, R.A. & Costa Lima, J.L.F. (1991). On-line monitoring of lipase production in fermentation processes. *Biotechnol. Technol.* 5: 251-254.
 138. Van Dijcken J.P., Otto R., Harder W. (1976). Growth of *Hansenula polymorpha* in the methanol-limited chemostat. *Arch.Microbiol* III:137-144.
 139. Veeraragaban, K. & Gibbs, B.F. (1989). Detection and partial purification of two lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnol. Lett.* 11 (5): 345-348.
 140. Verger, R., Rivière, C., Moreau, H., Gargouri, Y., Rogalska, E., Nury, S., Moulin, A., Ferrato, F., Ransac, S., Carrière, F., Cudrey, M. and Trétout, T. (1990). Enzyme Kinetics of Lipolysis. In "Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering". *Gbf Monographs*, 16, 105-116.
 141. Verger, R. (1997). Interfacial activation of lipase: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology.* 15: 32-38.
 142. Verhoeven, J.W., (1999) Glosario de términos usados en fotoquímica, 2ª edición Recomendaciones de la Comisión de Fotoquímica de la IUPAC, 1996 IUPAC, Glossary of terms used in photochemistry en *Pure and Applied Chemistry* 68 2223-2286; Universitat Autònoma de Barcelona, Servei de Publicacions Bellaterra, 1999.
 143. Villatte, F., Hussein A.S., Bachmann, T.T., Schmid R.D. (2001). Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55 (4):463.
 144. Wang Y., Liang Z-H., Zhang Y. S., Yao, S. Y., Hu Y. G., Tang, Y. H., Zhu S.Q., Cui, D.F., Feng Y.M. (2001). Human insulin from a precursor overexpression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotech. Bioengin.* 73(1): 74-79.
 145. Wu, S.H., Guo, Z.V. & Sih, C.J. (1990). Enhancing the enantioselectivity of *Candida* lipase catalyzed ester hydrolysis via noncovalent enzyme modification. *J. Am. Chem. Soc.* 112:1990-1995.
 146. White, B. (1993). *PCR Protocols: Current Methods and Applications*. Humana Press: 392.
 147. Xu Q, Wu X, Hou R, Liao M, Il KH, Shou J, Bian H, Han N, Pan J, Zhang Z, Zhu M. (2008) Mar 10, High-level secretory expression, purification and characterization of *Ailuropoda melanoleuca* growth hormone in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.*

148. Yamada, K. & Machida, H. (1962). J. Agr. Chem. Soc. Japan. 36:858
149. Yang Y., Lowe M.E. (1998). Human pancreatic triglyceride lipase expressed in yeast cells: purification and characterization. Protein Expr. Purif. 13: 36-40.
150. Yoshimasu M.A., Ahn J.K., Tanaka T., Yada R.Y. (2002). Soluble expression and purification of porcine pepsinogen form in *Pichia pastoris*. Protein Expr. Purif. 25: 229-236.

7.2- Bibliografía electrónica

Webs de consulta general:

Base de datos Medline-pubmed

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

Empresa Invitrogen, pagina web con manuales y medios de cultivos para trabajar con *P. pastoris*.

2. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>

Webs específicos:

Empresa Biospring:

3. www.biospring.de

Empresa constructora de secuencias de ADN a petición del interesado.

Búsqueda de secuencias de proteínas: ExPASy Molecular Biology Server

4. <http://www.expasy.ch>

Contiene accesos a las bases de datos Swiss-prot y prosite.

Búsqueda de secuencias de nucleotídicas:

5. <http://www.ncbi.nih.gov/Genbank>

Dispone accesos a las bases de datos de secuencias nucleotídicas

Esxtructura de distintos plásmidos:

6. <http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappuc1819.htm>

Contiene información sobre el plásmido pUC18/19

7. <http://www.invitrogen.com/search/index.cfm?fuseaction=search.simplesearch&searchterm=pPICZ>

Contiene información sobre el plásmido pPICZ

8. www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB063.pdf

Contiene información sobre el plásmido pET21

Protocolos de inducción y expresión de proteína en *E. coli*:

9. http://www.fhrc.org/science/labs/hahn/methods/biochem_meth/pet.pdf

Contiene el manual NOVAGEN pET System Manual

9.-Anexos

8.1- Código genético y frecuencias

Tabla 8.1.- Nombres y símbolos para los distintos aminoácidos.

Aminoácido	Símbolo en letras	
	tres letras	una letra
alanina	Ala	A
arginina	Arg	R
asparagina	Asn	N
ácido aspártico	Asp	D
cisteína	Cys	C
fenilalanina	Phe	F
glicina	Gly	G
ácido glutámico	Glu	E
glutamina	Gln	Q
histidina	His	H
isoleucina	Ile	I
leucina	Leu	L
lisina	lys	K
metionina	Met	M
prolina	Pro	P
serina	Ser	S
tirosina	Tyr	Y
treonina	Thr	T
triptófano	Trp	W
valina	Val	V

Tabla 8.2.- Codones de *Candida rugosa* y su frecuencia por 1000.

Triplete	F ⁻¹ * 1000	Triplete	F ⁻¹ * 1000	Triplete	F ⁻¹ * 1000	Triplete	F ⁻¹ * 1000
UUU	20.1	UCU	1.3	UAU	1.3	UGU	2.7
UUC	12.1	UCC	13.4	UAC	20.1	UGC	4.0
UUA	0.0	UCA	0.0	UAA	0.0	UGA	0.0
UUG	36.2	UCG	12.1	UAG	4.0	UGG	8.1
CUU	24.2	CCU	4.0	CGU	5.4	CAU	0.0
CUC	33.6	CCC	17.4	CAC	18.8	CGC	26.8
CUA	0.0	CCA	0.0	CAA	0.0	CGA	0.0
CUG	16.1	CCG	26.8	CAG	21.5	CGG	12.1
AUU	25.5	ACU	6.7	AAU	2.7	AGU	9.4
AUC	22.8	ACC	36.2	AAC	12.1	AGC	16.1
AUA	0.0	ACA	0.0	AAA	0.0	AGA	4.0
AUG	21.5	ACG	24.2	AAG	49.7	AGG	0.0
GUU	4.0	GCU	10.7	GAU	8.1	GGU	12.1
GUC	18.8	GCC	49.7	GAC	56.4	GGC	52.3
GUA	0.0	GCA	0.0	GAA	2.7	GGA	4.0
GUG	73.8	GCG	55.0	GAG	65.8	GGG	13.4

Codificación GC 63.76%; codones primera letra GC 63.36% segunda letra GC 42.82% y tercera letra GC 85.10%

Tabla 8.3.- Codones para *Pichia pastoris* y su frecuencia por 1000

Triplete	F ⁻¹ * 1000	Triplete	F ⁻¹ * 1000	Triplete	F ⁻¹ * 1000	Triplete	F ⁻¹ * 1000
UUU	23.4	UCU	23.7	UAU	14.3	UGU	8.3
UUC	20.4	UCC	16.4	UAC	18.8	UGC	4.3
UUA	14.9	UCA	14.9	UAA	0.9	UGA	0.3
UUG	32.2	UCG	6.8	UAG	0.5	UGG	9.8
CUU	15.6	CCU	15.3	CAU	10.7	CGU	7.0
CUC	7.3	CCC	6.4	CAC	9.4	CGC	2.2
CUA	10.6	CCA	17.8	CAA	24.0	CGA	4.4
CUG	15.2	CCG	3.9	CAG	14.7	CGG	2.1
AUU	31.3	ACU	22.9	AAU	22.5	AGU	12.0
AUC	20.0	ACC	14.4	AAC	25.9	AGC	7.1
AUA	11.1	ACA	13.6	AAA	29.4	AGA	20.6
AUG	19.3	ACG	6.0	AAG	36.2	AGG	6.4
GUU	27.5	GCU	30.3	GAU	36.2	GGU	27.9
GUC	15.6	GCC	17.4	GAC	26.7	GGC	8.2
GUA	9.5	GCA	15.3	GAA	38.9	GGA	19.4
GUG	12.2	GCG	3.6	GAG	30.3	GGG	6.1

Codificación GC 43.05% ; primera letra GC 49.15%; Segunda letra GC 37.45% y tercera letra GC 42.57%

8.2.- Diferentes calibrados

Calibrado de la actividad lipásica mediante el metodo colorimetrico.

El calibrado de la pendiente obtenida mediante el test de actividad lipásica descrito en la sección 4.256 se muestra en la Fig. 8.1.

Actividad Lipásica:

$$A \text{ (U/mL)} = 978.9878 m - 3.8289$$

En donde A es la actividad lipásica (U/mL) y m es la pendiente (Absorbancia/ tiempo)

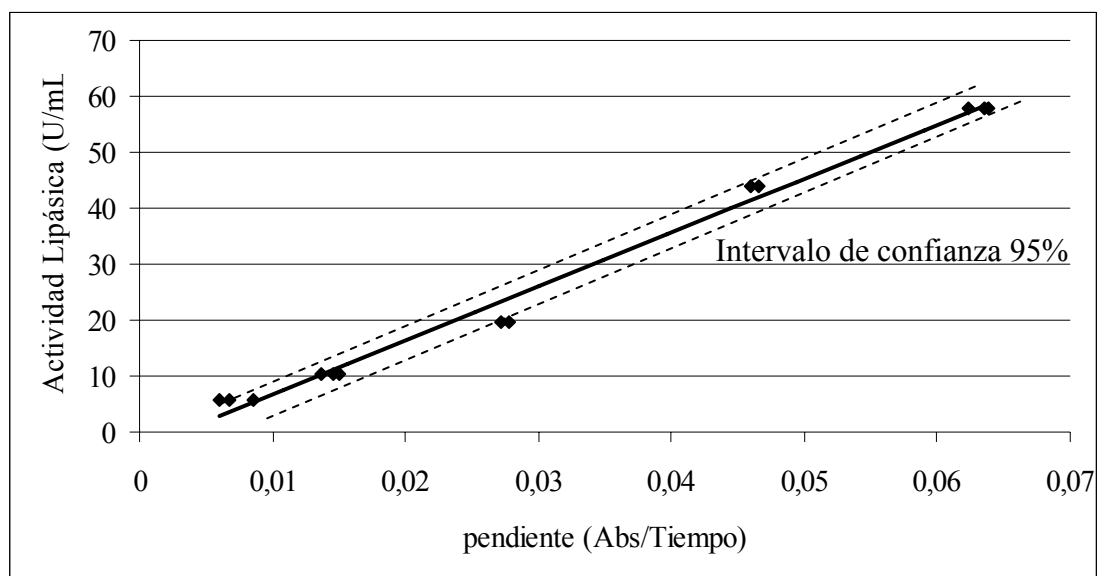


Fig. 8.1.- Calibrado de la actividad lipásica mediante el metodo colorimétrico de Roche.

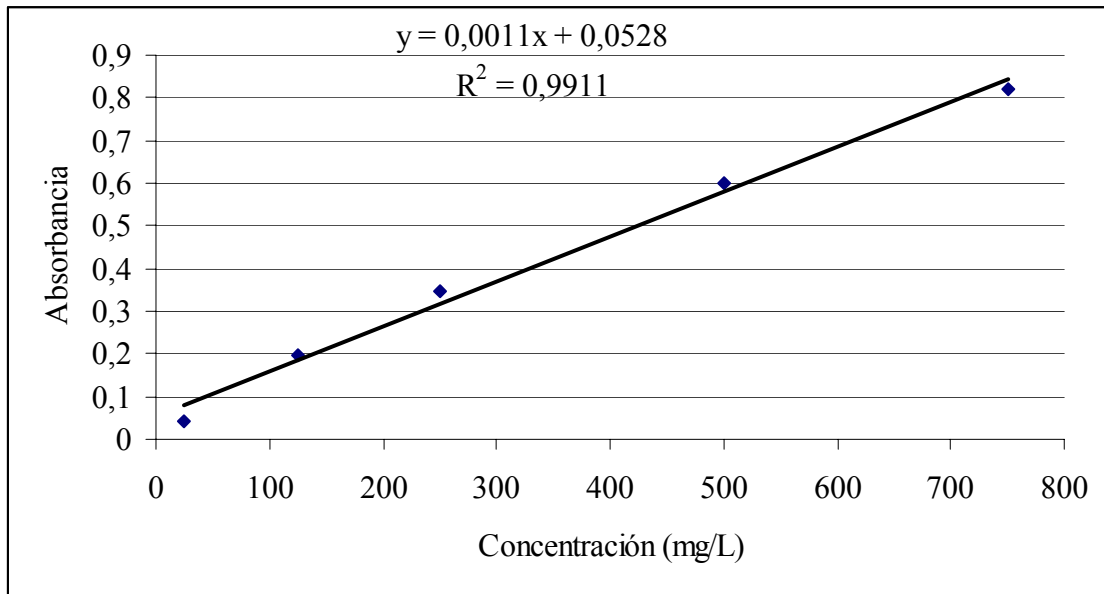
Calibración para análisis de proteína Bradford

Fig. 8.2.- Curva de calibración para análisis de proteína por método Bradford (rango alto).

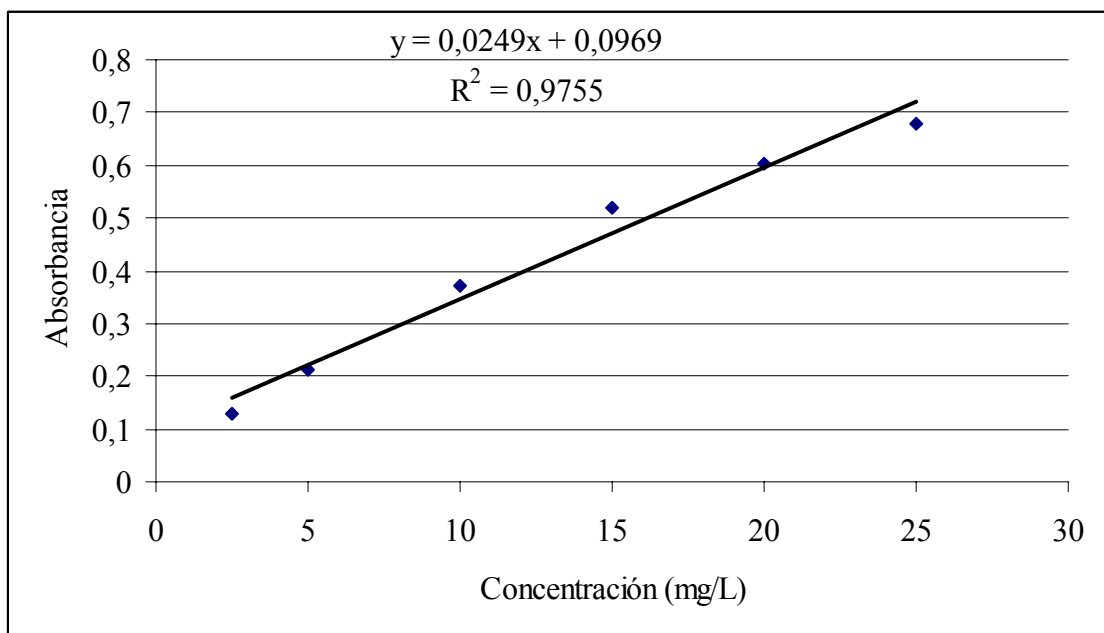


Fig. 8.3.- Curva de calibración para análisis de proteína por método Bradford (rango bajo).

8.3- Abreviaciones

AOX = alcohol oxidasa
aox = gen de la alcohol oxidasa
C. rugosa = *Candida rugosa*
Células CHO = células de ovario del hamster chino
Controlador PI = Controlador proporcional integrado
DHA = dihidroxiacetona
DNA = ácido dexosirribonucleico
E = Externa, referente a la expresión
E. coli = *Escherischia coli*
Fig. = figura
g = gramos
G. candidum = *Geotricum candidum*
GAP = gliceraldehido monofosfato
his⁺ = productor de histidina
his⁻ = auxotrofia para la histidina
his4 = gen histinol deshidrogenasa
I = Interna, referente a la expresión
Ibuprofeno = ácido 2-(p-isobutilfenil) propiónico
Kda= kilo Dalton
L = Litros
lip = gen de lipasa
Lip = Lipasa
 μ = velocidad específica de crecimiento
MF α 1 = prepro factor α
 μ g = microgramos
 μ L = microlitros
mg = miligramos
mL = miliLitros
mRNA = ácido ribonucleico mensajero
Mut⁺ = **M**ethanol **u**tilization plus
Mut⁻ = **M**ethanol **u**tilization negative
Mut^s = **M**ethanol **u**tilization slow
n = Haploide
P. pastoris = *Pichia pastoris*
Paox =promotor del gen de la alcohol oxidasa
Parámetros de las reacciones quirales
X = Conversión total
EE = Exceso enantiomérico
EF = Factor Enantiomérico
paraNitrofenoles:
C3 = Propionato
C4 = Butirato

C6 =Hexanoato

C8 =Octanoato

C10 =Decanoato

C12 =Dodecanoato

C16 = Palmitato

PCR= Reacción en cadena de la polimersa

pI = punto isoelectrico

PM = Peso Molecular

pO₂ = oxígeno disuelto

R_(1,2,3 ó 4)= Radical

RCT = Reserch Corporation Technologies

RT-PCR= transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimersa

S. cerevissiae = *Saccharomyces cerevissiae*

SCP = Single cell protein

Trigliceridos:

C2 = Triacetina

C4 = Tributirina

C6 = tricaproina

C8 =Tricaprylina

C10 = Tricaprina

C16= Tripalmitina

C18 = Tristearina

C18:1 = Trioleina

TPCH= trans-2-fenil-1- ciclohexanol

U= unidades de activida lipásica

UAB = Universitat Autònoma de Barcelona