

**INFLUENCIA DE LA BIOMASA Y LA CONCENTRACIÓN DE METANOL EN LA
PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE HEXOSAMINIDASA A EN
*Pichia pastoris***

Francy Liliana Hernández Pulido

**TRABAJO DE GRADO
PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR EL TÍTULO DE:**

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
MAYO 2014**

**INFLUENCIA DE LA BIOMASA Y LA CONCENTRACIÓN DE METANOL EN LA
PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE HEXOSAMINIDASA A EN
*Pichia pastoris***

Francy Liliana Hernández Pulido

CONCEPCIÓN JUDITH PUERTA BULA Ph.D.

Decana Facultad de Ciencias

JANETH ARIAS M.Sc.

Directora carrera Microbiología Industrial

**INFLUENCIA DE LA BIOMASA Y LA CONCENTRACIÓN DE METANOL EN LA
PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE HEXOSAMINIDASA A EN
*Pichia pastoris***

Francy Liliana Hernández Pulido

APROBADO

CARLOS JAVIER ALMÉCIGA-DÍAZ QF. Ph.D.

Director

ALEXANDER RODRIGUEZ LOPEZ L. Q.

Codirector

BALKYS ESMERALDA QUEVEDO HIDALGO I.Q. Ph.D.

Evaluador

NOTA DE ADVERTENCIA

ARTÍCULO 23 DE LA RESOLUCIÓN No.13 DE JULIO DE 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo por buscar verdad y justicia”

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones recibidas durante estos años de vida

A mi familia por todo el amor, fortaleza y apoyo incondicional que me han brindado en todas las etapas de mi vida, gracias a ellos estoy cumpliendo cada una de mis metas.

A mis directores Alexander Rodríguez L. Q. y Javier Alméciga QF. Ph.D por su paciencia infinita, por la enseñanza recibida y ayuda incondicional durante mi estadía en el IEIM.

A Dennis, Joko, Laura y a todos mis compañeros del IEIM por su amabilidad, compañerismo y colaboración.

A Camilo por todo el amor, apoyo y palabras de aliento durante este tiempo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO	10
1. MARCO TEORICO	12
1.1 Errores innatos del metabolismo	12
1.2 Enfermedad de Tat Sachs	12
1.3 Proteínas recombinantes y sistemas de expresión	14
2. OBJETIVO GENERAL	16
2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
3. METODOLOGIA	17
3.1 Determinación de curva de crecimiento de <i>Pichia pastoris</i>	17
3.1.1 Evaluación de crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> a escala de biorreactor	17
3.2 Evaluación a diferentes concentraciones de metanol y glicerol	17
3.3 Determinación de biomasa	18
3.4. Determinación de proteína total	18
3.5. Determinación de actividad específica y volumétrica de HexoA	19
3.6. Determinación de consumo de glicerol	19
3.7 Determinación de cinética de crecimiento	19
3.7. Determinación de tasa de crecimiento y de producción	19
3.8. Determinación de los rendimientos biomasa/producto, biomasa/sustrato y producto/sustrato	20
3.9 Determinación de las productividades de biomasa y proteína	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Evaluación de consumo de glicerol a escala de biorreactor de 1,65L	22
4.2 Comportamiento cinético del crecimiento de <i>Pichia pastoris</i>	23
4.3 Evaluación de crecimiento de biomasa y producción de proteína	25

4.4 Evaluación de la producción de Hexosaminidasa A en <i>Pichia pastoris</i> a escala de biorreactor de 1,65L	26
4.5 Evaluación de rendimientos y productividad	32
5. DISCUSION	37
6. CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42
ANEXOS	45

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1 Estructura del gangliósido GM2	13
Figura 2. Consumo de sustrato y crecimiento de biomasa a diferentes concentraciones de glicerol	22
Figura 3. Linealización Langmuir cultivo 4%	23
Figura 4. Linealización Langmuir cultivo 2%	24
Figura 5. Linealización Langmuir cultivo 1%	24
Figura 6. Seguimiento del crecimiento de biomasa	25
Figura 7. Cultivo a 1,65L 4% glicerol 0,5%v/v metanol	26
Figura 8. Cultivo a 1,65L 4% glicerol 0,1%v/v metanol	27
Figura 9. Cultivo a 1,65 L 2% glicerol 0,5% v/v metanol	28
Figura 10. Cultivo a 1,65L 2% glicerol 0,1% v/v metanol	29
Figura 11. Cultivo a 1,65L 1% glicerol 0,5% v/v metanol	30
Figura 12. Cultivo a 1,65L 1% glicerol 0,1% v/v metanol	31
Tabla 1. Máximos valores de concentración de biomasa, proteína y actividades de caca cultivo	32
Figura 13. Rendimiento biomasa/sustrato (X/S)	33
Figura 14. Rendimiento producto/sustrato (P/S)	33
Figura 15. Tasas de crecimiento (h^{-1}) cada uno de los cultivos 1,65L	34
Figura 16. Tasa de producción (mg/g/h) de cada uno de los cultivos 1,65L	34
Figura 17. Productividad de la biomasa de cada uno de los cultivos a 1,65L	35
Figura 18. Productividad de proteína de cada uno de los cultivos a 1,65L	36

RESUMEN

En la actualidad la terapia de remplazo enzimático es una alternativa prometedora para el tratamiento de algunos errores innatos del metabolismo. Las enzimas empleadas para este fin son producidas de forma recombinante empleando diversos sistemas de expresión como lo son las bacterias, levaduras y células de animales o plantas. En el caso de las levaduras una de las más empleadas ha sido *Pichia pastoris*, la cual ha mostrado varias ventajas frente a los demás sistemas en cuanto a su productividad. Sin embargo, factores relacionados con las condiciones de cultivo, y concentración de biomasa o inductor tienen efectos importantes sobre la producción de la enzima recombinante. En este sentido, en el presente proyecto se caracterizaron los niveles de producción de la enzima Hexosaminidasa A producida de forma recombinante en la levadura *P. pastoris*, bajo diferentes concentraciones de biomasa y metanol. Con los resultados obtenidos se construyó un modelo para observar el comportamiento cinético de *Pichia pastoris* con un sustrato limitante. Los resultados mostraron que los mayores valores de actividad enzimática fueron obtenidos con una concentración inicial de glicerol de 4% y con una concentración de metanol del 0,5% durante la fase de inducción. Los resultados obtenidos en el presente trabajo constituyen información importante en el desarrollo de un proceso de producción eficiente de la enzima recombinante Hexosaminidasa A para uso en terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Tay Sachs.

Justificación y planteamiento

Los errores innatos del metabolismo se originan por el defecto en un gen, que produce cambios en la estructura y/o función de una proteína. La severidad de la enfermedad depende de la importancia de la proteína defectuosa en el metabolismo. La presentación de estas enfermedades se puede dar en un amplio rango, desde una forma leve hasta una severa. Este tipo de enfermedades son poco frecuentes y su tratamiento, en la mayoría de los casos, implica altos costos para los pacientes y los sistemas de salud (Barrera, 2009).

La enfermedad de Tay Sachs es un error innato del metabolismo neurodegenerativo causado por la deficiencia de la enzima lisosomal Hexosaminidasa A (Hexo A), causando la acumulación de gangliósidos tipo GM2 en diferentes tejidos [Roy, capítulo 153]. Esta acumulación genera diferentes signos y síntomas, afectando principalmente el sistema nervioso central. En este tipo de enfermedades, la Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE) se plantea como la principal estrategia terapéutica. En esta terapia, al paciente se le suministra de manera exógena la enzima deficiente, para así lograr la disminución de los compuestos acumulados. Para el uso de la TRE es necesaria la producción de grandes cantidades de la enzima, por lo que el uso de proteínas recombinantes representa en la actualidad la alternativa empleada para la producción de estas enzimas. Para obtener una enzima recombinante humana con fines terapéuticos, se requiere de sistemas de expresión que tengan buenos rendimientos y que produzcan una enzima similar a la humana [Roy, capítulo 153].

En el IEIM se ha venido trabajando en la producción de enzimas recombinantes con fines terapéuticos en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*. Este último microorganismo tiene ventajas importantes, como son los altos niveles de producción, estabilidad genética y modificaciones postraduccionales similares a las encontradas en humano.

Para la producción de una proteína recombinante a escala de biorreactor es importante considerar aspectos moleculares (uso de codones, promotor,

direccionamiento celular, etc), así como también optimizar los diferentes aspectos que afectan el bioproceso. Con el objetivo de aumentar los niveles de producción de la enzima Hexosaminidasa A recombinante humana producida en *Pichia pastoris*, en este trabajo se evaluaron variables como la concentración de glicerol en la fase de crecimiento y de metanol en la fase de inducción, con el fin de identificar las mejores condiciones que permitan una mayor productividad de la enzima. La ejecución de este proyecto permitirá obtener un proceso más eficiente y que pueda servir de base para la producción de otras enzimas heterólogas en este sistema de expresión.

1. Marco teórico

1.1 Errores innatos del metabolismo

Los errores innatos del metabolismo (IEM) fueron descritos por primera vez por Sir Archibald Garrod 1902. Los trastornos descritos inicialmente fueron alcaptonuria, pentosuria, albinismo y la cistinuria (Kamboj, 2008). En la mayoría de los casos los EIM son enfermedades poco frecuentes que se originan por la mutación en un gen produciendo el daño en la estructura o función de una proteína involucrada en el metabolismo de carbohidratos, mucopolisacáridos, aminoácidos, lípidos o ácidos nucleicos. La manifestación de la enfermedad puede darse en un amplio espectro que puede ser leve o severa, mientras que otros pacientes pueden permanecer asintomáticos (Barrera,2009). Las enfermedades de depósito lisosomal se caracterizan por el acumulo de macromoléculas sin metabolizar en el lisosoma. Se originan por la deficiencia de enzimas que participan en el metabolismo de mucopolisacaridosis, gangliósidos, glucógeno, esfingolípidos, entre otros (Barrera,2009).

1.2 Enfermedad de Tay Sachs

La enfermedad de Tay-Sachs (ETS, también conocida como gangliosidosis G_{M2}) es debida a la disminución total o parcial en la actividad de la enzima β -Hexosaminidasa A (Hexo A) y la acumulación lisosomal resultante del gangliósido G_{M2} , en particular en el sistema nervioso (Tropak,2010). Los gangliósidos son un grupo de esfingolípidos, compuestos por una ceramida hidrofóbica que normalmente se ancla a un oligosacárido hidrofílico de diferentes longitudes que se enfrenta al entorno extracelular. Las células neuronales parecen ser los productores primarios de los gangliósidos superiores, es decir, aquellos con cadenas de oligosacáridos más complejas (Slámová, 2010). La degradación lisosomal de los gangliósidos se lleva a cabo en forma secuencial (Slámová, 2010).

Las hexosaminidasas son enzimas que se procesan y ensamblan en el retículo endoplasmático en tres isoformas HEXA ($\alpha\beta$), HEXB ($\beta\beta$) y HEXS ($\alpha\alpha$), cada una

de estas enzimas son diferentes y la deficiencia en la dos primeras está asociada con la aparición de distintas enfermedades. La primera isoenzima (HEXA, EC. 3.2.1.52) cataliza la hidólisis del residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) del gángliósido Gm2 (Mahuran, 2008; Henrissat et al.,1997) (Figura 1), con la ayuda de la proteína activadora GM2, para así lograr la hidrólisis intralisosomal de este compuesto (Tropak,2010).

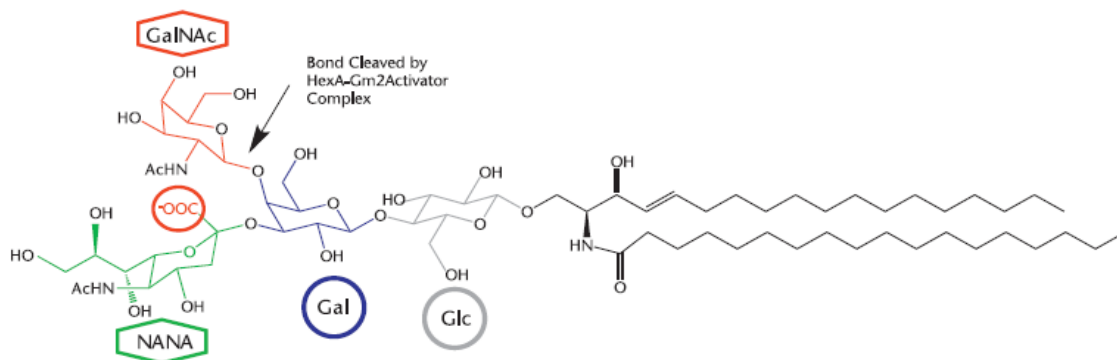


Figura 1. Estructura del gángliósido. Indicando el punto de corte de Hexosaminidasa A. (Tomada de Encyclopedia of life sciences & 2010, John Wiley & Sons, Ltd)

HexA puede llevar a cabo la hidrólisis de β -GalNAc y N-acetilglucosamina a partir de sustratos tales como restos de oligosacáridos de las proteínas y glicolípidos. La hidrólisis del gángliósido GM₂, que contiene un grupo de ácido siálico con carga negativa, sin embargo, se lleva a cabo sólo por la subunidad α de Hex A. La especificidad de esta reacción se hace absoluta por el mecanismo por el cual el complejo GM₂ interactúa con el heterodímero Hex A (Hepbildikler, 2002)

1.3 Proteínas recombinantes y sistemas de expresión

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica productora de cultivos de alta densidad celular en sustratos económicos tales como glicerol y metanol. Tiene la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales y un alto rendimiento de proteína. En la actualidad, esta levadura es ampliamente usada como sistemas de expresión de proteínas heterólogas con fines terapéuticos (Cereghino, 2000).

P. pastoris es especialmente adecuada para la expresión de proteínas heterólogas, por diferentes razones: puede ser fácilmente manipulada a nivel molecular, puede expresar altos niveles de proteínas en forma intra o extracelular, y puede realizar modificaciones postraduccionales similares a las de las proteínas eucariotas superiores, tales como N-glicosilaciones, formación de puentes disulfuro y el procesamiento proteolítico (Potvin,2012). Debido a estas características algunas proteínas que no se pueden expresar de manera eficiente en bacterias o *Saccharomyces* se han producido con éxito en *P. pastoris* (Gao,2013). Las técnicas genéticas disponibles, junto con su economía de uso, hacen de *P. pastoris* un sistema interesante para la expresión de proteínas heterólogas. (Potvin,2012).

Comúnmente, la expresión de la proteína heteróloga en *Pichia pastoris* se realiza bajo el control del promotor inducible de la alcohol oxidasa (AOX1). El promotor AOX1 es fuertemente reprimido cuando las células son cultivadas en glucosa u otras fuentes de carbono, pero se induce más de 1000 veces cuando el microorganismo se cambian a un medio que contiene metanol como única fuente de carbono. Esto hace que este sistema de expresión tenga una preferencia por un metabolismo aerobio en lugar de uno fermentativo, lo cual evita alcanzar rápidamente niveles tóxicos de metanol en el medio (Cereghino,2000)

El promotor AOX1 regula más de la mitad de la producción del alcohol oxidasa mientras que el promotor AOX2 es menos activo (Daly, 2005). El sistema de expresión de *P. pastoris* hace uso de los dos promotores para regular la expresión de proteínas heterólogas utilizando el metanol como inductor (Jiménez,1997). Durante la transformación de la levadura con el gen de la proteína de interés, la recombinación genética puede generar tres fenotipos diferentes dependiendo del locus de inserción: Mut⁺ el cual es capaz de utilizar rápidamente y en grandes cantidades el metanol, Mut^S que utiliza lentamente el metanol y Mut⁻ el cual no utiliza el metanol como fuente de carbono (Potvin,2012).

El fenotipo Mut^S es el más utilizado para la producción de proteínas recombinantes ya que con él se reducen los problemas operativos como por ejemplo los

requerimientos mayores de metanol y oxígeno disuelto comparado con las cepas Mut⁺ (Jiménez,1997). Adicionalmente, las cepas con fenotipo Mut^S alcanzan mayores niveles de expresión de la proteína que los observados con cepas Mut⁺ (Jungo,2007).

Aunque la expresión de proteínas heterólogas se puede hacer en cultivos a pequeña escala, los niveles de proteína son típicamente mucho más altos en cultivos a escala de biorreactor. Debido a que el medio de cultivo para *P. pastoris* es económico y bien definido, esta levadura es casi ideal para la producción a gran escala de proteínas heterólogas en biorreactores. Los parámetros más importantes a ser controlados son el pH, la aireación y la velocidad de alimentación de la fuente de carbono (Gao,2013)

Con el objetivo de obtener una alta producción de enzima recombinante HexoA en *Pichia pastoris* a escala de biorreactor este trabajo busca evaluar el impacto que tienen sobre la producción de la proteína diferentes parámetros como son la concentración de biomasa antes de inducción y la concentración de metanol durante la etapa de inducción.

2. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de la concentración de biomasa al momento de comenzar la inducción y de la concentración de metanol durante la fase de inducción, en la producción de la enzima recombinante Hexosaminidasa A en *Pichia pastoris*

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construir un modelo matemático que explique el crecimiento de la cepa *Pichia pastoris*-Hexo A en función del consumo del sustrato (Modelo Monod)
2. Caracterizar el efecto de la concentración de biomasa, al momento de comenzar la inducción, sobre la producción de la enzima recombinante Hexosaminidasa A
3. Caracterizar el efecto de la concentración de metanol sobre la producción de la enzima recombinante Hexosaminidasa A

3. METODOLOGÍA

3.1 DETERMINACIÓN DE CURVA DE CRECIMIENTO DE *Pichia pastoris*

3.1.1 Evaluación del crecimiento de *Pichia pastoris* a escala de biorreactor

A partir del banco de cepas del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo se tomaron viales del clon de *Pichia pastoris* previamente transformada con el gen que expresa la enzima Hexo A (Espejo J, Mosquera A, Rodriguez A, Alméciga-Díaz CJ, Barrera LA, datos sin publicar). Dos viales del clon fueron inoculados en 10 ml de caldo YPD (1% p/v extracto de levadura, 2%p/v peptona, 2% p/v dextrosa) y se incubó por 48 horas, 28°C a 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación se pasó el preinóculo a 180 ml de medio MGli (1,34% p/v YNB, 1% p/v glicerol y 4×10^{-5} % p/v de biotina), se incubó por 24 horas a 28°C a 200 rpm. Los 200 ml se inocularon en 1450 ml de medio BSM (Glicerol; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,60 g/L; KH_2PO_4 25,74 g/L; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 3 g/L; K_2SO_4 8,58 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,02 g/L) para obtener un volumen final de trabajo de 1,65 L. Finalmente se adicionaron 1,7 mL de solución de trazas minerales PTM4 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,0 g; NaI 0,08 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3,0 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, H_3BO_3 0,02 g; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; CoCl_2 0,5 g, ZnCl_2 7,0 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,0 g; Biotina 0,2 g; 1,0 mL H_2SO_4 concentrado), 1 mL de antiespumante de silicona y 3 mL de Biotina al 4×10^{-5} % p/v . Las concentraciones de glicerol evaluadas en el medio BSM fueron 4, 2 y 1% v/v. El pH del cultivo se mantuvo en 5,0 ajustándose con hidróxido de amonio al 7%, la temperatura se mantuvo constante a 28 °C y la agitación en valores entre 600-950 rpm aumentando las revoluciones a medida que el microorganismo consumía el sustrato. La fase de crecimiento se extendió hasta observar una elevación en los valores de oxígeno disuelto, lo cual era indicativo que el sustrato (glicerol) había sido consumido en su totalidad. Durante esta fase se tomaron alícuotas cada 2h.

3.2 EVALUACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE METANOL A ESCALA DE BIORREACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMA RECOMBINANTE HEXOSAMINIDASA A

Una vez terminada la fase de inducción con cada una de las concentraciones de glicerol, se continuó con la fase de inducción bajo diferentes concentraciones de metanol para evaluar el efecto de la concentración del agente inductor sobre la producción de la enzima recombinante. De acuerdo a resultados obtenidos en anteriores trabajos con la cepa de estudio, la fase de inducción se realizó durante 96 h, controlando el pH a 5,0, la temperatura a 28 °C y la agitación entre 650-950 rpm de acuerdo con el comportamiento del microorganismo para mantener niveles de oxígeno disuelto inferiores al 10% (Pimentel 2013). En total se realizaron 6 cultivos, modificando la concentración del glicerol en el medio BSM (4, 2 y 1% v/v), cada uno inducido con 0,1 o 0,5 % de metanol. Durante la fase de inducción se tomaron alícuotas de aproximadamente 5 mL cada 8h.

3.3 DETERMINACIÓN DE BIOMASA

Para determinar la concentración de biomasa presente en cada uno de los muestreos a escala de biorreactor 1,65L, se determinó la densidad óptica (DO) a 600 nm haciendo diluciones seriadas a partir de cada una de las muestras tomadas. Con estos valores, se calculó la concentración de biomasa (g/L) empleando la curva de calibración reportada por Córdoba, 2003:

$$\text{Concentración biomasa g/L} = ((0.619 * DO_{600nm})/0.529) * \frac{1}{fd} \quad R^2:0,99$$

3.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Para la cuantificación de proteína total las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min a 4°C. La proteína presente en el sobrenadante se cuantificó por el método de Follin-Lowry (Anexo 1), empleando una curva de calibración de BSA entre 0,12 y 2 mg/mL.

3.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA Y VOLUMETRICA DE HEXOSAMINIDASA A

La actividad Hexosaminidasa se determinó empleando el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil-6-sulfo-N-acetil-β-D-glucosamina (CALBIOCHEM). La reacción de actividad enzimática se realizó empleando el protocolo previamente estandarizado en el laboratorio (Anexo 2). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la reacción de 1 nmol de sustrato por hora. Las unidades de actividad (U) se calcularon empleando la siguiente ecuación:

$$\frac{A-B}{C} * 3 = U$$

En donde A representa la fluorescencia de la muestra, B la fluorescencia del blanco, C la fluorescencia de 1 nmol de 4MU. Para la actividad específica (U/mg), se dividió por la cantidad de proteína empleada en el ensayo enzimática, mientras que para para la actividad volumétrica (U/ml), se dividió entre el volumen de muestra empleado.

3.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLICEROL

Para determinar el consumo de glicerol a través del tiempo de cada uno de los cultivos, las alícuotas tomadas durante la fase de crecimiento se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos a 4°C. El glicerol presente en el sobrenadante se cuantificó empleando el estuche de triglicéridos glicerol fosfato oxidasa/ peroxidasa (Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 3). El cálculo de la concentración de glicerol se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración glicerol g/L} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia patrón}} * \text{Concentración patrón}$$

3.7 DETERMINACIÓN DE CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Pichia pastoris* CON EL MODELO MONOD, UTILIZANDO EL MÉTODO DIFERENCIAL DE ANÁLISIS LANGMUIR

El modelo Monod describe la interacción entre el crecimiento de un microorganismo en un cultivo por lotes y la utilización del sustrato limitante del crecimiento. (Duarte, A) La siguiente ecuación fue empleada para calcular el

Monod, en donde μ_M es la velocidad máxima de crecimiento, S concentración del sustrato limitante y K_s es la constante de afinidad por el sustrato.

$$\frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{1}{x} \cdot r_x = \frac{\mu_M \cdot s}{K_s + s}$$

El método diferencial empleado fue Langmuir, el objetivo del método es la evaluación de las velocidades de crecimiento de biomasa y de consumo de sustrato, a partir de los datos experimentales de las concentraciones de biomasa y sustrato en función del tiempo (Duarte, A) . Se calculó con la siguiente ecuación: .

$$\frac{s}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_M} + \frac{1}{\mu_M} \cdot s$$

La representación gráfica de s/μ en función de s, corresponde a una línea recta cuyo intercepto es K_s/μ_M y cuya pendiente es $1/\mu_M$.

3.8 DETERMINACIÓN DE TASA DE CRECIMIENTO Y DE TASA DE PRODUCCIÓN

La tasa de crecimiento (h^{-1}) se calculó teniendo en cuenta el cambio de la concentración de biomasa en el tiempo y la tasa de producción (mg de proteína/g de biomasa/h) fue calculada teniendo en cuenta el cambio de la concentración de proteína en el tiempo. Utilizando las siguientes ecuaciones:

$$(a) \quad \frac{dX}{dt} = \frac{X_{k+1} - X_{k-1}}{X_k \cdot \Delta t}$$

$$(b) \quad \frac{dP}{dt} = \frac{P_{k+1} - P_{k-1}}{X_k \cdot \Delta t}$$

en donde X es biomasa (g/L), P es proteína (mg/L), k es el momento de toma de muestra, k-1 es la muestra anterior, k+1 es la muestra siguiente y Δt es el tiempo en entre k-1 y k+1 en h.

3.9. DETERMINACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS BIOMASA/PRODUCTO, BIOMASA/SUSTRATO Y PRODUCTO/SUSTRATO.

El rendimiento producto/biomasa ($Y_{P/X}$) dado como g de proteína/g de biomasa, se calculó con la ecuación (c).

$$(c) \quad Y_{P/X} = \frac{P_k}{X_k}$$

$$(d) \quad Y_{AE/X} = \frac{AE_k}{X_k}$$

La tasa de consumo se calculó con la ecuación (e), en donde $\Delta S/\Delta t$ corresponde a la pendiente de consumo de los datos recuperados del programa controlador de metanol. Estas velocidades de consumo fueron empleadas para calcular los rendimientos empleando las ecuaciones (f) y (g).

$$(e) \quad \frac{dS}{dt} = \frac{\Delta S}{X_k * \Delta t}$$

$$(f) \quad Y_{X/S} = \frac{dX}{dS}$$

$$(g) \quad Y_{P/S} = \frac{dP}{dS}$$

4.0 DETERMINACIÓN DE LAS PRODUCTIVIDADES DE BIOMASA Y DE PROTEÍNA

Las productividades se calcularon relacionando los g de biomasa o mg proteína obtenidos en 1,65 L de cultivo en el tiempo de inducción y están dados en g de biomasa/h y mg de proteína/h respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación de consumo de glicerol a escala de biorreactor.

En la *figura 2* se observan los resultados de biomasa y concentración de glicerol durante la fase de crecimiento para los cultivos realizados a diferentes concentraciones de glicerol inicial. En los cultivos de 4% glicerol inicial se obtuvo una biomasa final de 73,42 y 84,99 g/L, con un consumo total del glicerol las 27 h y 25 h de cultivo, respectivamente. Con la concentración 2% de glicerol la biomasa alcanzada fue de 38,92 y 36,17 g/L g/L, con un consumo total del glicerol a las 17 y 18 h de cultivo, respectivamente, Finalmente, en los cultivos con 1% de glicerol, la biomasa final fue de 18,11 y 19,20 g/L, a las 14 h de cultivo para los dos cultivos.

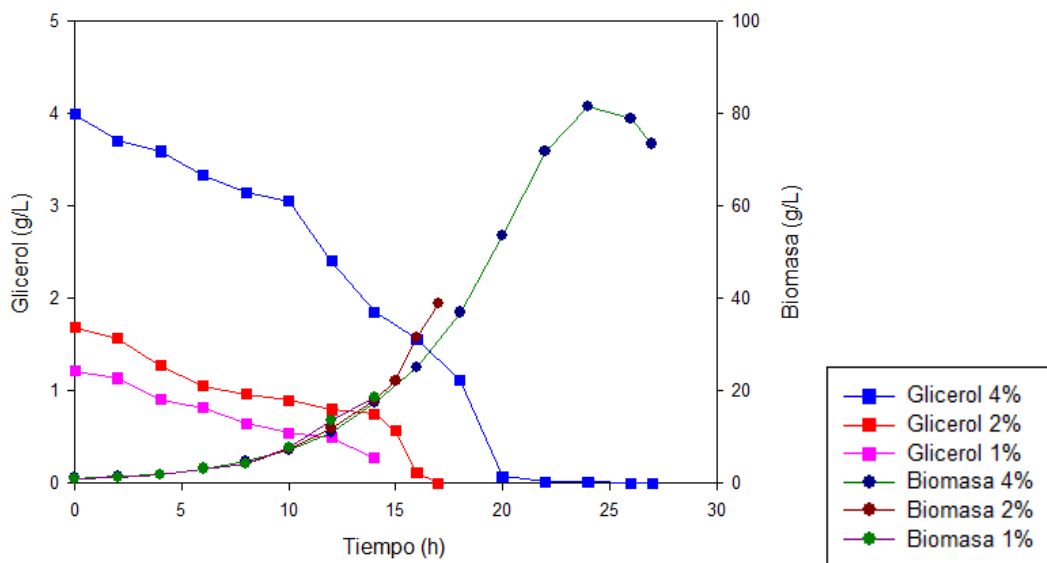


Figura 2. Biomasa y concentración de glicerol durante la fase de crecimiento bajo diferentes concentraciones de glicerol inicial.

4.2 Comportamiento cinético del crecimiento de *Pichia pastoris*.

De acuerdo a lo obtenido con el MONOD, en la *figura 3* se observa la gráfica que corresponde a la linealización de los cultivos de 4% glicerol por medio del modelo de Langmuir. De acuerdo a la gráfica se obtuvo un K_s de 0,8404 g/L y una $\mu_{\text{máxima}}$ de 0,264 h^{-1} con un $R^2 = 0,929$

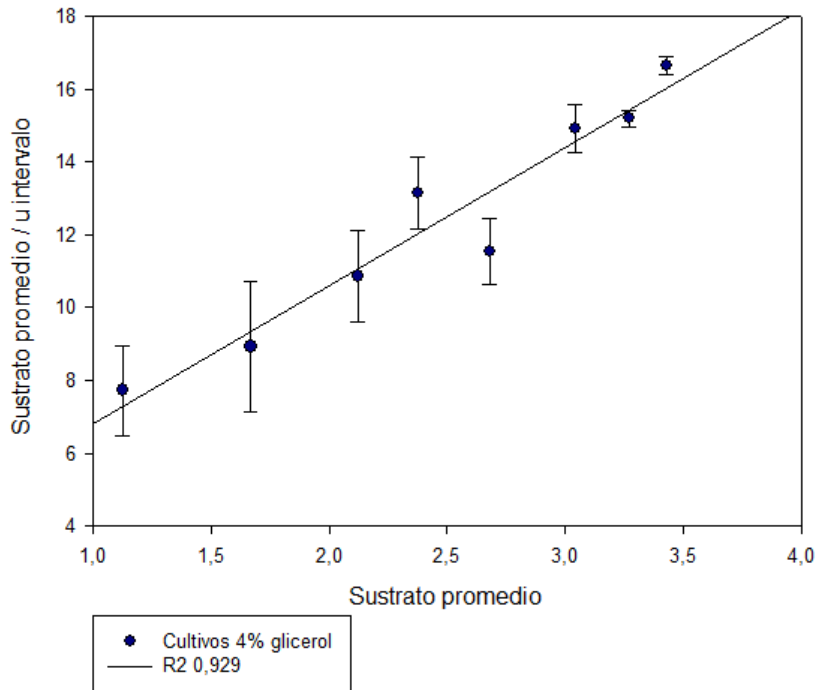


Figura 3. Linealización por el modelo de Langmuir de los cultivos de 4% glicerol.

En la *figura 4* se observan los resultados correspondientes a la linealización de los cultivos de 2% glicerol por medio del modelo de Langmuir. Para estas condiciones se obtuvo un K_s de 0,2871 g/L y una $\mu_{\text{máxima}}$ de 0,254 h^{-1} con un $R^2 = 0,950$

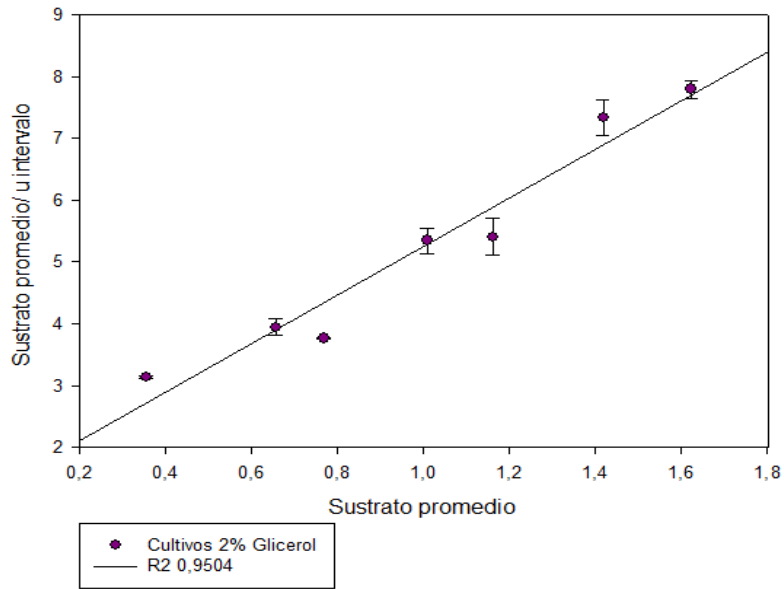


Figura 4. Linealización por el modelo de Langmuir de los cultivos de 2% glicerol.

Finalmente, en la la *figura 5* se observa los resultados de linealización de los cultivos realizados con 1% glicerol por medio del modelo de Langmuir. De acuerdo a la gráfica se obtuvo un K_s de 0,5835 g/L y una $\mu_{\text{máxima}}$ de 0,289 h^{-1} con un $R^2 = 0,933$.

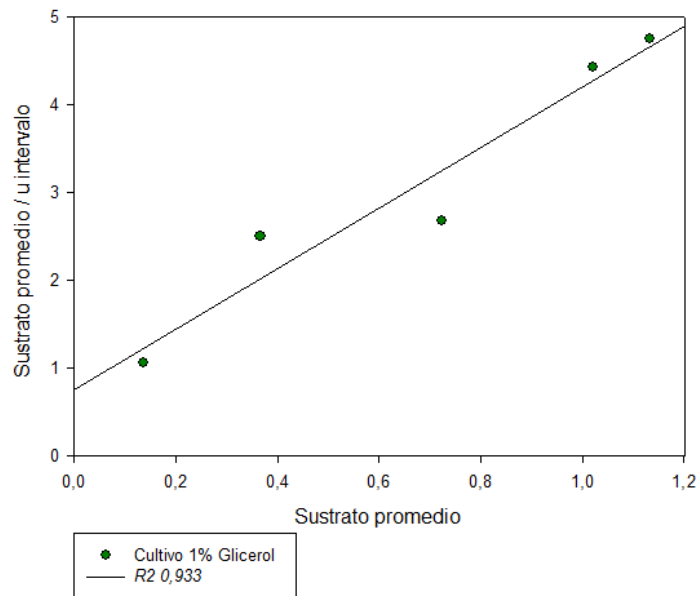


Figura 5. Linealización por el modelo de Langmuir del cultivo 1% glicerol.

En general, estos resultados muestran que el K_s varia entre 0,29 y 0,84 g/L dependiendo de la concentración del glicerol e igualmente la velocidad máxima de crecimiento oscilo entre 0,25 y 0,28 h^{-1} . La mejor afinidad por el sustrato lo mostró el cultivo con 2% glicerol con una velocidad máxima de crecimiento de 0,254 h^{-1} .

4.3 Evaluación de crecimiento de biomasa y producción de proteína durante la fase de inducción

En la *figura 6* se observan los resultados de biomasa durante las fases de crecimiento e inducción para cada una de las concentraciones de glicerol y metanol. Se puede observar que la mayor concentración de biomasa se obtuvo en los cultivos con 4% glicerol, alcanzando biomasa final de 196,96 g/L y 195,49 g/L, con 0,5 y 0,1% de metanol, respectivamente. En los cultivos con 2% de glicerol la biomasa final fue de 185,81 g/L y 193,73 g/L, con 0,5 y 0,1% de metanol, respectivamente. Finalmente, con 1% de glicerol los valores finales de biomasa fueron de 167,35 g/L y 167,94 g/L, con 0,5 y 0,1% de metanol, respectivamente

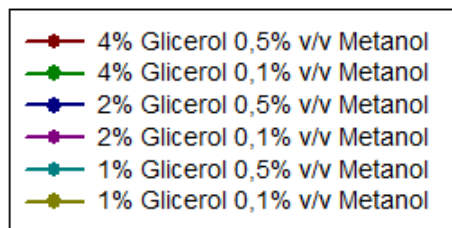
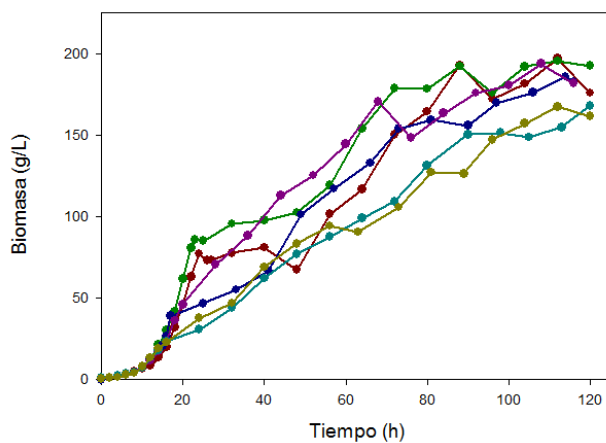


Figura 6. Cuantificación de biomasa durante la fase de inducción bajo diferentes concentraciones de glicerol y metanol. La inducción para los cultivos con 1, 2 y 4% de glicerol se realizaron a las 14, 18 y 26 h de cultivo, respectivamente.

4.4 Evaluación de la producción de Hexosaminidasa A en *Pichia pastoris* a escala de biorreactor.

En la *figura 7* se observan los resultados del cultivo con una concentración inicial de 4% de glicerol y una concentración de metanol de 0,5% v/v, la cual se mantuvo constante durante la fase de inducción. La concentración de proteína presentó un aumento constante durante la fase de inducción, alcanzando un valor de 1,62 mg/mL, al final del cultivo. Con respecto a los valores de actividad enzimática, los mayores valores de actividad específica y volumétrica fueron de 60,43 U/mg (112 h) y 120,57 U/mL (120 h), respectivamente.

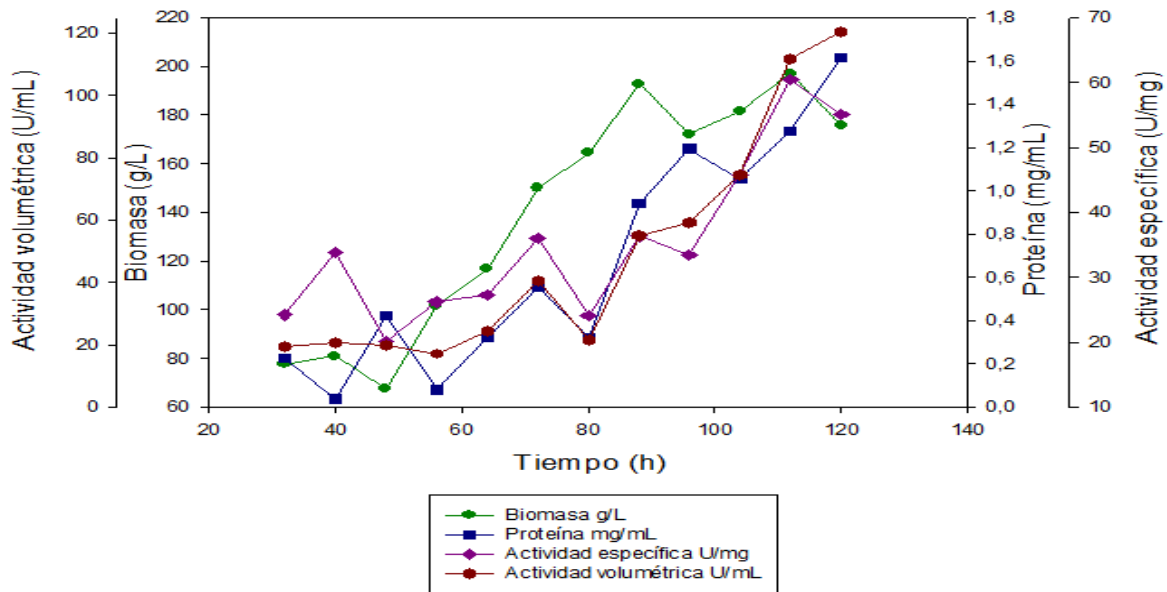


Figura 7. Seguimiento de biomasa, concentración de proteína y actividad específica y volumétrica HexA durante la fase de inducción para el cultivo con 4% de glicerol y 0,5% de metanol

En la *figura 8* se observan los resultados del cultivo con concentración inicial de 4% de glicerol y concentración de metanol de 0,1% durante toda la fase de inducción. La mayor concentración de proteína se alcanzó a las 112h con un valor de 2,04 mg/mL, manteniéndose alrededor de este valor hasta el final del cultivo. Los mayores valores de actividad específica y volumétrica fueron de 36,11 U/mg y 92,74 U/mL a la hora 112.

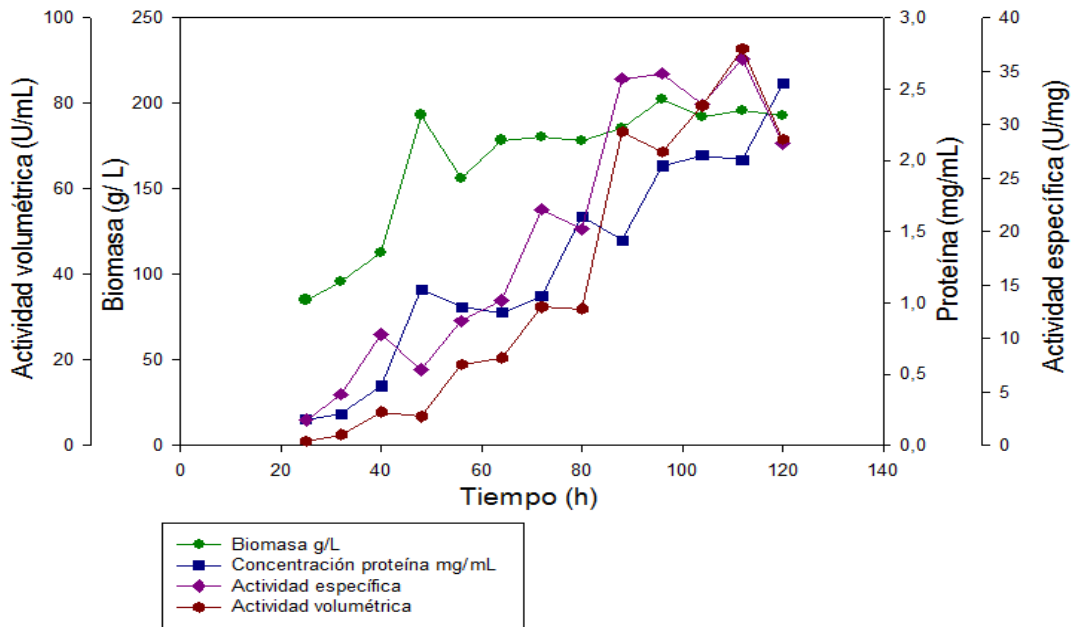


Figura 8. Seguimiento de biomasa, concentración de proteína y actividad específica y volumétrica HexA durante la fase de inducción para el cultivo a con 4% de glicerol y 0,1% de metanol

En la *figura 9* se observan los resultados para el cultivo con concentración inicial de 2% glicerol y 0,5% de metanol durante la fase de inducción. La mayor concentración de proteína se alcanzó a las 97 h de cultivo con un valor de 2,37 mg/mL, y presentando posteriormente una leve disminución hasta un valor final de 2,2mg/mL. Con respecto a los valores de actividad enzimática, los mayores valores de actividad específica y volumétrica se alcanzaron hacia el final del cultivo con 37,59 U/mg y 101,1 U/mL, respectivamente,

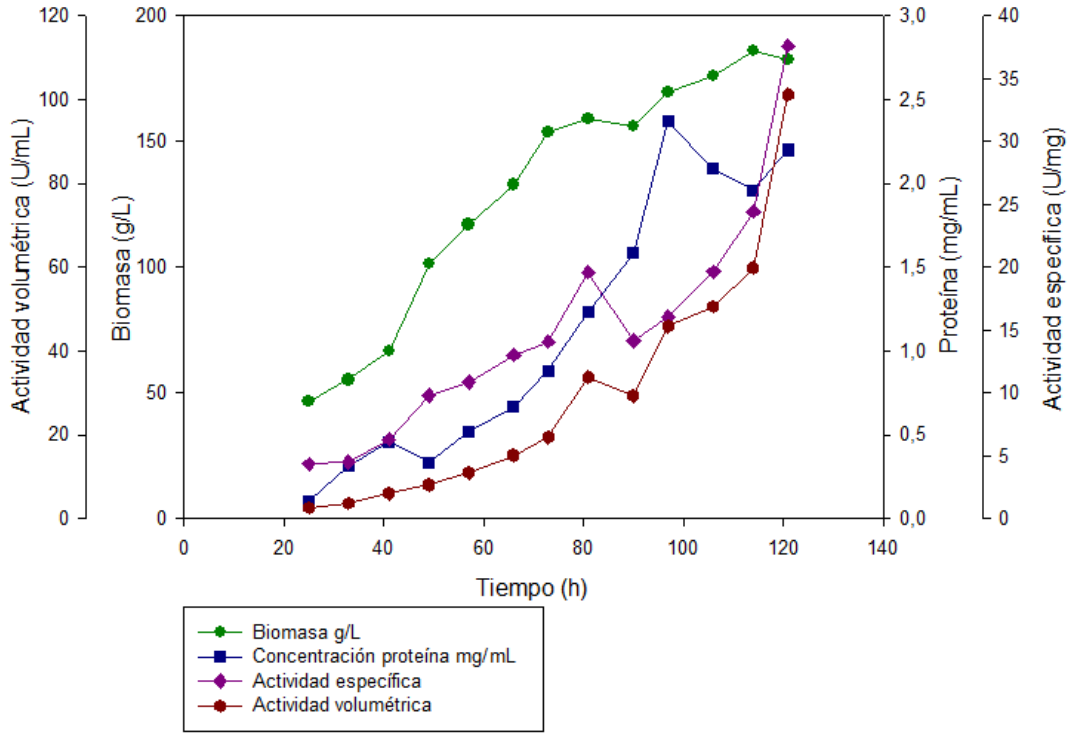


Figura 9. Seguimiento de biomasa, concentración de proteína y actividad específica y volumétrica HexA durante la fase de inducción para el cultivo a con 2% de glicerol y 0,5% de metanol

En la *figura 10* se observan los resultados para el cultivo con concentración inicial de 2% glicerol y 0,1 de metanol durante la etapa de inducción. La mayor concentración de biomasa se alcanzó a la hora 116 con 195,78 g/L. La mayor concentración de proteína se alcanzó a las 100 h de cultivo con un valor de 2,07 mg/mL. Con respecto a los valores de actividad enzimática, los mayores valores de actividad específica y volumétrica se observaron hacia las 108 h de cultivo con valores de 14,57 U/mg (108 h) y 40,84 U/mL, respectivamente.

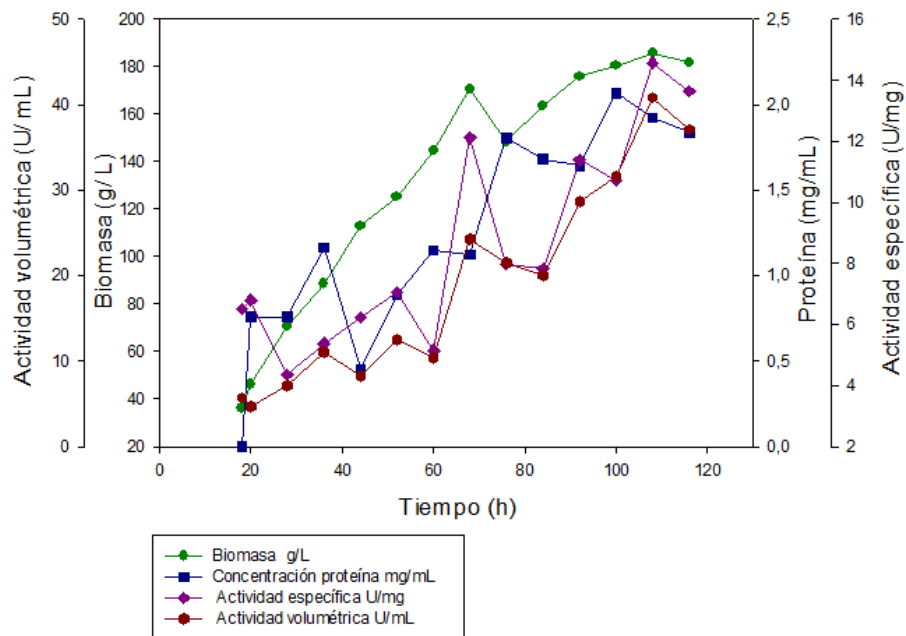


Figura 10. Seguimiento de biomasa, concentración de proteína y actividad específica y volumétrica HexA durante la fase de inducción para el cultivo a con 2% de glicerol y 0,1% de metanol

En la *figura 11* se observan los resultados para el cultivo con concentración inicial de 1% glicerol y 0,5 % de metanol durante la fase de inducción. La máxima biomasa obtenida bajo estas condiciones fue de 167,94 g/L al final de cultivo. Por su parte, la máxima concentración de proteína se obtuvo a las 105 h con un valor de 2,74 mg/mL. Con respecto a los valores de actividad enzimática, los mayores valores de actividad específica y volumétrica fueron 19,85 U/mg (48 h) y 45,69 U/mL (105 h), respectivamente.

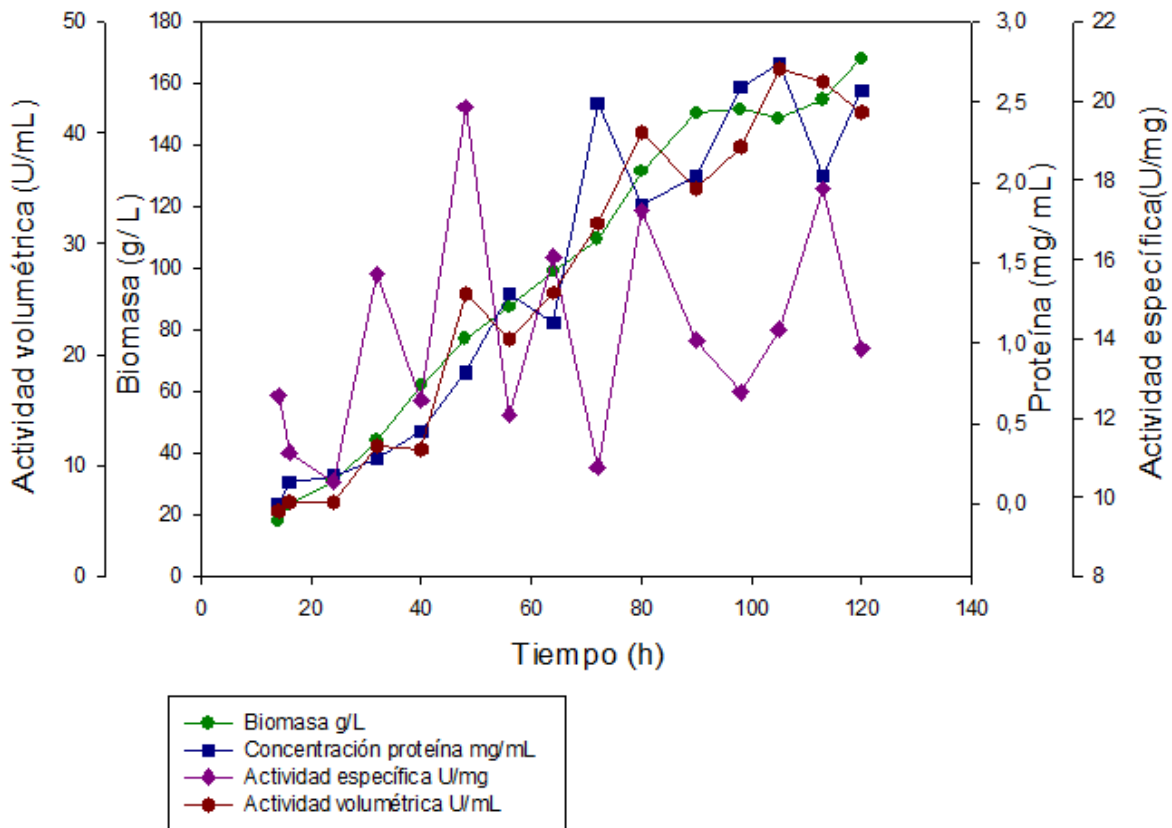


Figura 11. Seguimiento de biomasa, concentración de proteína y actividad específica y volumétrica HexA durante la fase de inducción para el cultivo a con 1% de glicerol y 0,5% de metanol

Finalmente, en la *figura 12* se muestran los resultados para el cultivo con concentración inicial de 1% glicerol y concentración de metanol de 0,1 % durante la fase de inducción. Bajo estas condiciones la máxima biomasa se alcanzó a las 112 h de cultivo con un valor de 167,35 g/L. La mayor concentración de proteína se alcanzó a las 56 h con un valor de 1,61 mg/mL. Con respecto a los valores de actividad enzimática, los mayores valores de actividad específica y volumétrica fueron 23,06 U/mg (112 h) y 35,47 U/mL (120 h).

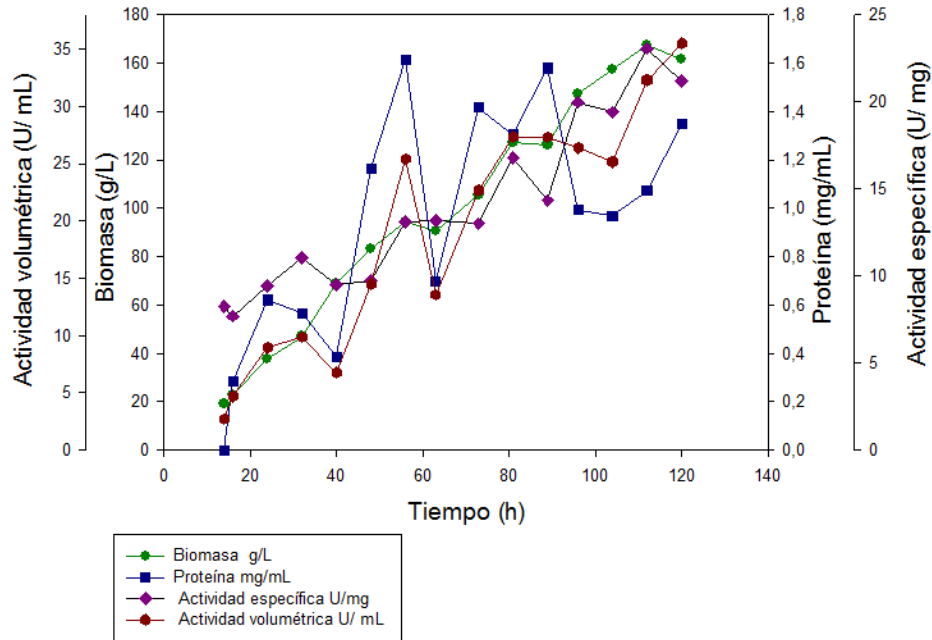


Figura 12. Seguimiento de biomasa, concentración de proteína y actividad específica y volumétrica HexA durante la fase de inducción para el cultivo a con 1% de glicerol y 0,1% de metanol

La Tabla 1 resume los resultados de los máximos valores de biomasa, concentración de proteína y actividad enzimática observada bajo las concentraciones de glicerol y metanol evaluados. Se observa que la mayor concentración de biomasa se obtuvo con 4% glicerol - 0,5% metanol, la mayor concentración de proteína fue el cultivo 1% glicerol 0,5% v/v metanol, los mayores valores de actividad específica y volumétrica se obtuvo en el cultivo 4% glicerol 0,5% v/v metanol. La mejor concentración de metanol independiente de la de glicerol es la de 0,5%v/v

Tabla 1. Valores máximos de biomasa, concentración de proteína y actividad enzimática para los cultivos realizados bajo diferentes concentraciones de glicerol y metanol.

Glicerol (% v/v)	Metanol (% v/v)	Biomasa (g/L)	Proteína (mg/ml)	Actividad volumétrica (U/mL)	Actividad específica (U/mg)
1	0,1	167,35	1,61	35,47	23,06
	0,5	167,94	2,74	45,69	19,85
2	0,1	195,78	2,07	40,84	14,57
	0,5	185,82	2,37	101,1	37,59
4	0,1	194,49	2,04	92,74	36,1
	0,5	196,96	1,62	120,57	60,43

4.5 Estimación de rendimientos y productividad.

En la *figura 13* se observan los resultados de la estimación del rendimiento biomasa/sustrato para los cultivos realizados. Se observa que el valor más alto fue para el cultivo 4% glicerol - 0,1% metanol obteniendo 2,49 g biomasa/g metanol a la hora 64. En la *figura 14* se observan los resultados de la estimación del rendimiento producto para los cultivos realizados, obteniéndose el mayor rendimiento para el cultivo el cultivo 2% glicerol - 0,1%v/v metanol con un valor de 79,42 mg proteína/g de metanol.

De acuerdo a las tasas de crecimiento (*Figura 15*) se observa que los cultivos con valores más altos fueron los realizados con 1% glicerol obteniendo valores de 0,08 h⁻¹ y 0,07 h⁻¹, mientras que el cultivo de 4% glicerol – 0,1 metanol presentó la menor tasa de crecimiento. En la *figura 16* se observa los resultados de la estimación de las tasas de producción obteniendo los mejores resultados con el cultivo 1% glicerol - 0,1%v/v metanol con 2,72 mg de proteína/g biomasa/h.

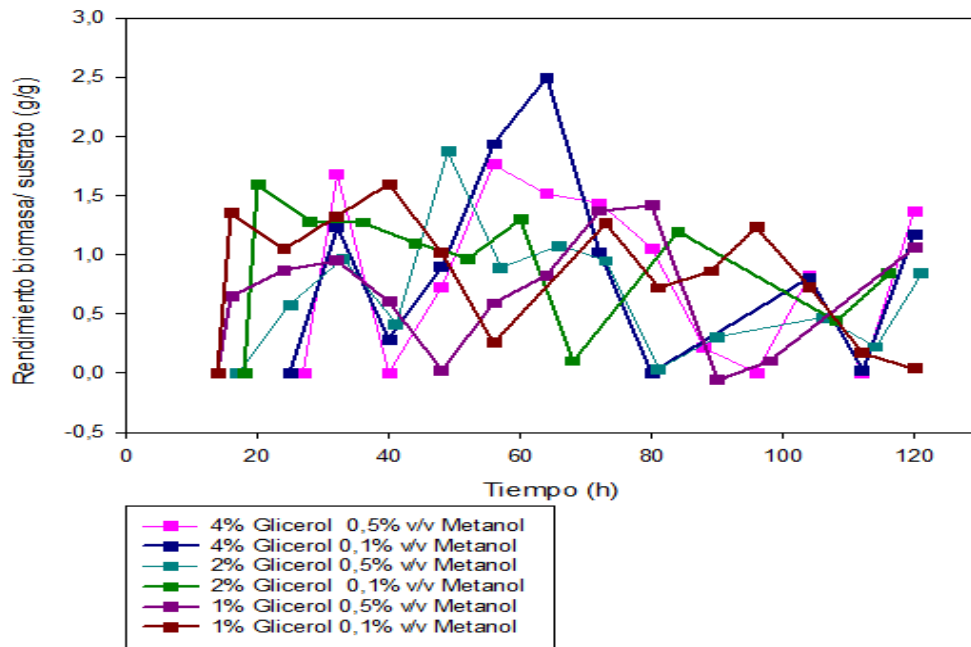


Figura 13. Rendimiento biomasa/sustrato (g biomasa/g metanol) de cada uno de los cultivos durante la fase de inducción.

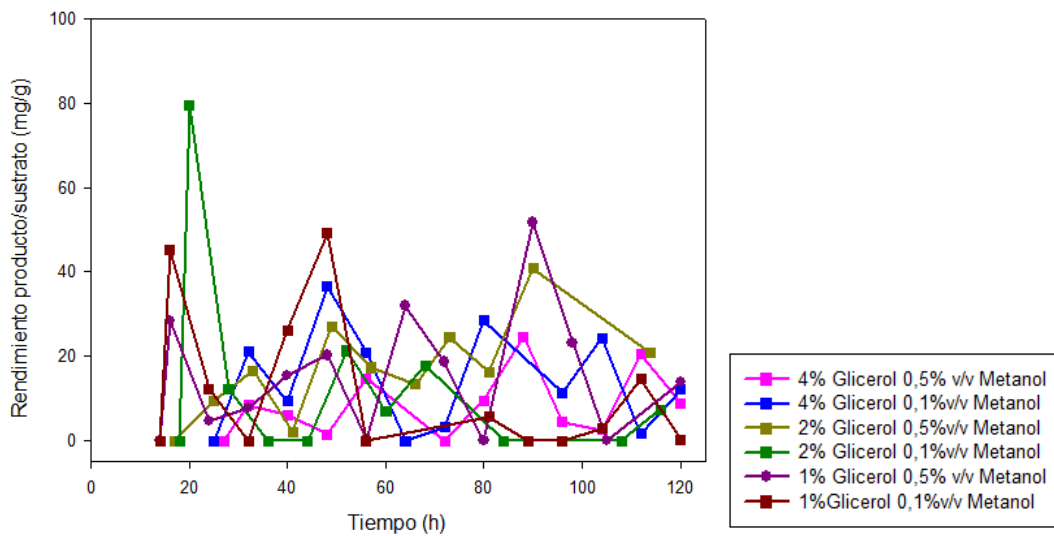


Figura 14. Rendimiento producto/sustrato (mg proteína/g metanol) de cada uno de los cultivos durante la fase de inducción.

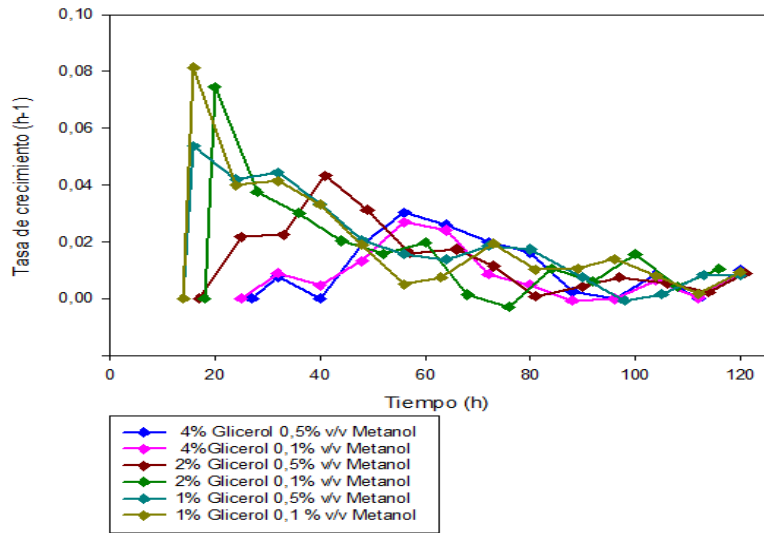


Figura 15. Determinación de tasas de crecimiento para cada uno de los cultivos durante la fase de inducción.

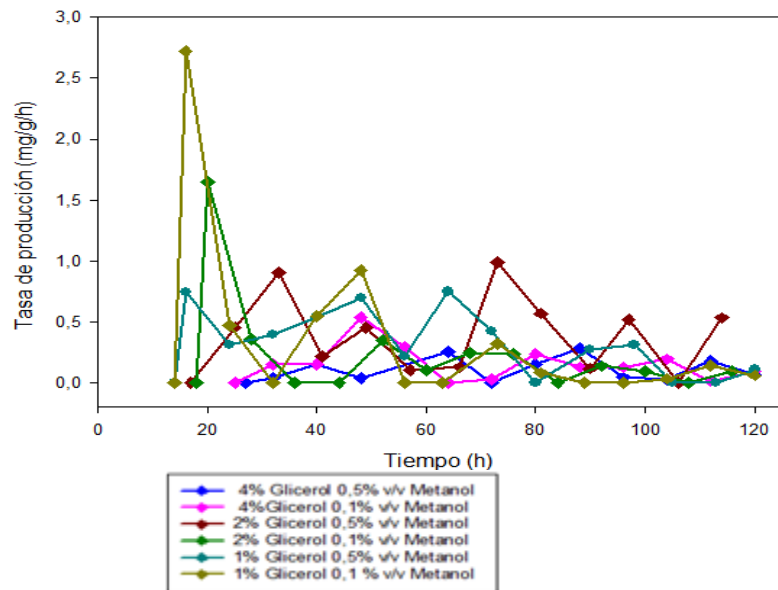


Figura 16. Determinación de tasas de producción para cada uno de los cultivos durante la fase de inducción.

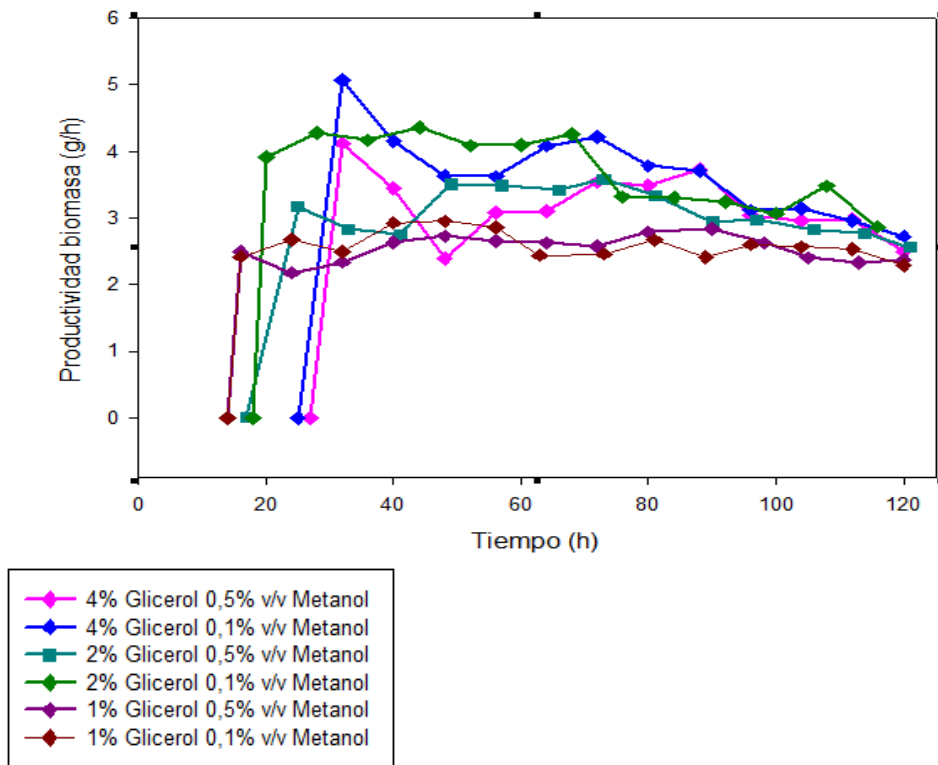


Figura 17. Productividad de la biomasa para cada uno de los cultivos durante la fase de inducción

En la *figura 17* se observa la productividad para cada uno de los cultivos, en donde se muestra que los mejores resultados se obtuvieron con el cultivo 4% glicerol - 0,1% metanol con un valor de 5,0 g biomasa/h, mientras que el cultivo con el menor valor de productividad fue el de 1% glicerol - 0,1% metanol. En la *figura 18* se observan los valores de productividad de proteína, en donde se obtiene los valores más altos en el cultivo 2% glicerol - 0,1% metanol con 65 g proteína/h.

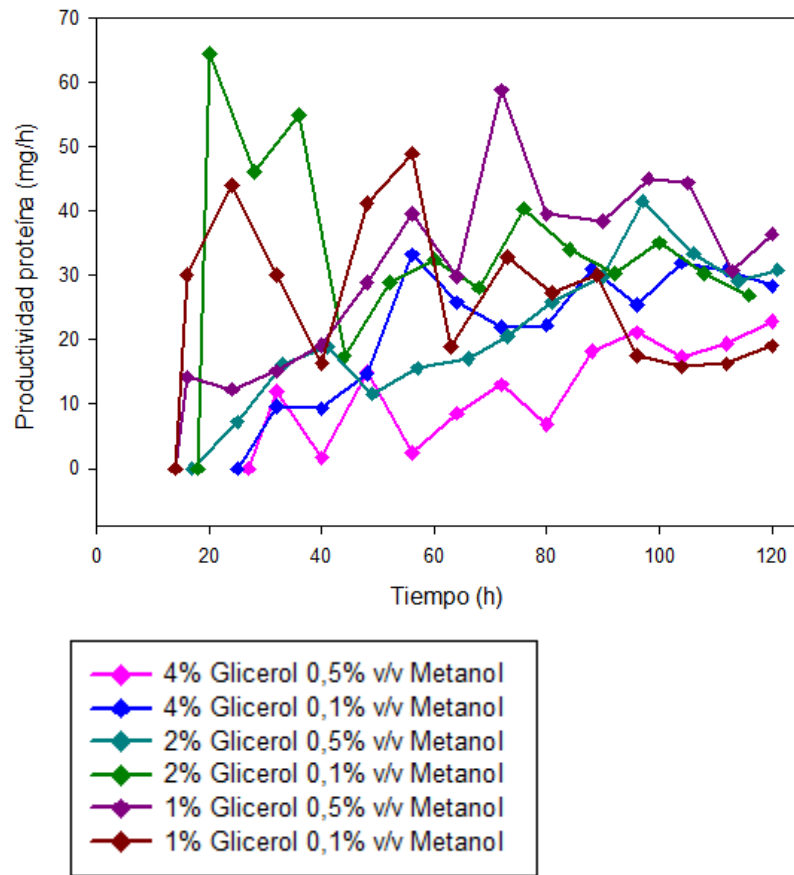


Figura 18. Productividad de la proteína para cada uno de los cultivos durante la fase de inducción

5. DISCUSION

El desarrollo de una terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Tay Sachs requiere la producción de elevados niveles de la proteína recombinante para las diferentes etapas clínicas asociadas al desarrollo de un producto farmacéutico. En este sentido, es de gran importancia evaluar los diferentes factores que pueden aumentar la producción de la enzima recombinante. En este proyecto se evaluó la influencia de la biomasa y la concentración de metanol sobre la producción de la enzima recombinante humana Hexosaminidasa A en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

Para lograr una alta producción de proteína recombinante realizada por *Pichia pastoris* es necesario evaluar diferentes condiciones para establecer los parámetros que permitan la mayor producción de la proteína de interés.

De acuerdo al comportamiento cinético del crecimiento celular de *Pichia pastoris* con un sustrato limitante, en este caso glicerol a diferentes concentraciones, se pudo comparar entre los cultivos la constante de afinidad (K_s) dando como mejor resultado el cultivo de 2% glicerol debido a su bajo valor comparado con los otras concentraciones ya que según lo reportado por (Celik,2009), indicando que entre menor sea el valor del K_s mayor afinidad por el sustrato, alcanzando la velocidad máxima de crecimiento en menor tiempo (Celik,2009). Con respecto a la velocidad máxima de crecimiento (μ máxima) el cultivo de mayor valor fue el de 1% con $0,289 \text{ h}^{-1}$, aunque no hubo mucha diferencia con respecto a los valores de las otras concentraciones de glicerol. De acuerdo a lo reportado por (Ghosalkar, *et al* 2008), la μ máxima obtenida utilizando como única fuente de carbono el glicerol fue de $0,23 \text{ h}^{-1}$, lo cual indica una similitud entre los valores obtenidos. Con respecto al K_s se reporta $0,178 \text{ g/L}$ (Ghosalkar, *et al* 2008), comparado con los resultados obtenidos es mayor, lo cual se puede deber al cambio método diferencial de análisis, pues en el trabajo los autores reportaron Lineweaver-Burk.

De acuerdo a lo encontrado en literatura, las mejores condiciones de producción de una proteína recombinante en *P. pastoris*, tales como el medio de cultivo, pH y temperatura dependen de la cepa utilizada y la proteína recombinante a expresar (Freitas et al.,2010). Trabajos previos realizados en el IEIM han mostrado que temperatura de 28 °C y pH 5,0 permiten obtener mayores valores biomasa con *P. pastoris* con el medio BSM (Pimentel,2013; Córdoba et al, 2009). Sin embargo, el efecto de la concentración de la biomasa al momento de la inducción, así como de la concentración del agente inductor no se había estudiado. Los resultados mostraron que los mayores valores de biomasa durante la fase de crecimiento e inducción se lograron con una concentración inicial de glicerol del 4%. De acuerdo a lo reportado por García *et al* 2013 comparando dos fuentes de carbono (glicerol y glucosa) se obtuvo un mayor crecimiento utilizando glicerol como fuente de carbono lo cual se debe a que *Pichia pastoris* utiliza residuos de glicerol para formación de subproductos como acetato y etanol. También se observó que independientemente de la concentración inicial de glicerol, no se afectó la fase de adaptación del microorganismo. Por el contrario, como era de esperar, a mayor concentración de glicerol mayor es el tiempo necesario para su consumo y por lo tanto mayor es el tiempo de la fase exponencial.

Según lo reportado por Wu *et al.*, 2011 los mayores crecimientos en metanol se observaron con 0,5% v/v, mientras que el menor crecimiento se obtuvo con 0,25%, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente proyecto en donde el mayor crecimiento se obtuvo con 0,5% de metanol en comparación con lo obtenido con 0,1%. Sin embargo, en las primeras horas de inducción la mayor tasa de crecimiento se observó en los cultivos con las menores concentraciones de metanol y glicerol. Esto puede deberse gracias a que el metanol actuó como fuente de carbono en las concentraciones bajas de biomasa ayudando al crecimiento, mientras que en los cultivos con mayor concentración de biomasa el metanol fue empleado para la producción de la proteína (Wu *et al.*, 2011).

Con respecto a la tasa de producción, los mayores resultados se obtuvieron con 0,1% metanol. Este resultado sugiere que es importante mantener la

concentración de metanol adecuada para mantener la actividad de las células y controlar la tasa de crecimiento específico para optimizar la formación de producto (Wu *et al.*, 2011)

Comparando las actividades enzimáticas de cada uno de los cultivos se observó que la actividad volumétrica y específica disminuyó a medida que se disminuía la concentración inicial de biomasa al momento de inducción (menores concentraciones de glicerol inicial). De igual forma, la concentración de metanol afectó de forma considerablemente los valores de actividad enzimática disminuída con concentración baja de metanol, lo cual concuerda con lo reportado por Sinha *et al.*, 2007. La concentración de células en el inicio de la fase de inducción ha mostrado jugar un papel importante en la producción de proteína recombinante, pues para lograr una producción de la proteína recombinante de interés es deseable contar con concentraciones elevadas de biomasa. En este aspecto, los mayores valores de actividad HexA, en la mayoría de los cultivos, se produjo en las horas finales del cultivo, momento en el cual también se observaron los mayores valores de biomasa

Los mayores valores de actividad HexA se obtuvieron con el cultivo con mayor concentración de glicerol y metanol utilizado en este estudio (4% glicerol 0,5%v/v metanol). Estos resultados confirman el hecho de que el aumento en la biomasa favorece la producción de la enzima recombinante HexA. Estos resultados sugieren que el metanol suministrado al cultivo es utilizado por el microorganismo tanto para la producción de la proteína como para el crecimiento del microorganismo.

Finalmente, de acuerdo con la *figura 10* el mayor rendimiento se obtuvo con una concentración menor de glicerol y de metanol, lo cual concuerda con lo descrito por Wang *et al.*, (2009), quienes reportaron que el mejor rendimiento para la producción de poligalacturonato liasa se observó con bajas concentraciones de biomasa inicial, mientras que estos valores aumentaban a medida que lo hacía la biomasa.

En resumen, estos resultados permitieron definir las concentraciones de glicerol y metanol para la producción de la enzima recombinante humana HexA en *P. pastoris*, lo cual permitirá continuar los estudios de purificación, caracterización, y evaluación in-vitro e in-vivo de esta proteína.

Conclusiones

1. Se construyó un modelo Monod para explicar el crecimiento de la cepa durante la primera fase de cultivo. El modelo evidenció que la mejor afinidad por el sustrato lo mostró el cultivo con 2% glicerol con una velocidad máxima de crecimiento de $0,254 \text{ h}^{-1}$.
2. Los mayores valores de actividad enzimática HexA se observaron cuando la inducción se comenzó con la biomasa más alta (73,42 g/L), obteniendo valores de 120,55 U/ml y 60,43 U/mg.
3. Los mayores valores de actividad enzimática se observaron con glicerol 4% y metanol 0,5% mostrando la importancia de establecer la concentración adecuada de estos dos compuestos para favorecer la producción de la enzima recombinante.

BIBLIOGRAFIA

Barrera, LA. 2009 Estudios bioquímicos de los errores innatos del metabolismo en Colombia durante dos décadas. Rev Acad Colomb Cienc. 2009 33(128): 377-394

Çelik E, Çalık P, Oliver SG. 2009. A structured kinetics model for recombinant protein production by Mut⁺ strain of *Pichia pastoris*. Chemical Engineering Science. 12/1; 64 (23) :5028-5035.

Cereghino JL, Cregg JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev 1; 24 (1) :45-66.

Daly R, Milton T. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. J. Mol. Recognit.; 18: 119–138.

Duarte A. Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod. Facultad de ingeniería. Universidad Nacional de Colombia.

Freitas Sanches Peres M, Silva VC, Valentini SR, de Lucca Gattas EA. 2010. Recombinant expression of glicerol- 3-phosphate dehydrogenase using the *Pichia pastoris* system. J molec Catal B 8; 65 (1-4) :128-132.

GAO M, SHI Z. 2013. Process control and optimization for heterologous protein production by Methylotropic *Pichia pastoris*. China J Chem. Eng. 2; 21 (2) :216-22

García-Ortega X, Ferrer P, Montesinos JL. 2013. Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter. Biochem Eng J 10/15; 79 (0) :172-181.

Ghosalkar A, Sahai V, Srivastava A. 2008. Optimization of chemical defined medium for recombinant pichia pastoris for biomass production. Bioresource Technology. 11; 99 (16):7906-7910.

Henrissat B, Davies G.1997.Structural and sequence- based classification of glycoside hydrolases. Curr Opin Struct Biol 10; 7 (5): 637-644.

Henry A. Córdoba-Ruiz, Raúl A. Poutou-Piñales, Olga Y. Echeverri-Peña, Néstor A. Algecira-Enciso, Patricia Landázuri, Homero Sáenz and Luis A. Barrera-Avellaneda. 2009. Laboratory scale production of the human recombinant iduronate 2-sulfate sulfatase-Like from *Pichia pastoris*. African Journal of Biotechnology. 8(9): 1786-1792

Hepbildikler S, Sandhoff R, Kolzer M, Proia R.2002. Physiological substrates for human lysosomal B-hexosaminidase S*. Glycobiology and extracellular matrices. J.Bio. Chem. 10; 277(74):2562-2572.

Jiménez ER, Sánchez K, Roca H, Delgado JM. 1997. Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase. BiotechnolTech;11(7):461-466.

Jungo C, Marison I, von Stockar.2007. Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut+ strain in transient continuous cultures. J Biotechnology 6/30; 130 (3) :236-246.

Kamboj M. 2008. Clinical Approach to the Diagnoses of Inborn Errors of Metabolism. Pediatrics Clin North Am 10;55(5):1113-1127.

Mahuran DJ. 2008. The GM2 activator protein, it's roles as a co-factor in GM2 hydrlisis ans as a general glycolipid trasnport protein .Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 7/31; 1393 (1):1-18

Pimentel N, 2013. Evaluación de los niveles de producción de Iduronato 2-sulfato sulfatasa (IDS) en dos cepas de *Pichia pastoris* bajo condiciones limitadas de oxígeno y sustrato. Tesis de pregrado. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

Potvin G, Ahmad A, Zhang Z. 2012 Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J* 64(0):91-105.

Roy G, Kaback M, Proia R, Sandhoff K, Suzuki K, Suzuki K. *Lysosomal Disorders. The online metabolic and molecular bases of inherited Disease. Capítulo 153, 16.*

Sinha J, M Inan, Fanders S, Taoka S, Gouthro M, Swanson T, et al. 2007. Cell bank characterization and fermentation optimization for production of recombinant heavy chain C-terminal fragment of botulinum neurotoxin serotype E(rBoNTE(Hc):Antigen E) by *Pichia pastoris*. *J Biotechnology* 1/10; 127 (3) :462-474.

Slámová K, Bojarová P, Petrásková L, Křen V. 2010. B-N-Acetylhexosaminidase: What's is name..?. *Biotechnology Advances*. (12).

Tropak M, Mahuran J. 2010. Tay Sachs Disease. University Ave. 58-60

Wang Y, Wang Z, Du G, Hua Z, Liu L, Li J, et al. 2009. Enhanced of alkaline polygalacturonate lyase production in recombinant *Pichia pastoris* according to the ratio of methanol to cell concentration. *Bioresource Technology* 2; 100 (3) :1343-1349.

Wu D, J Chu, Hao Y, Wang Y, Zhuang Y, Zhang S. 2011. High efficient production of recombinant human consensus interferon mutant in high cell density culture of *Pichia pastoris* using two phases methanol control. 8; 46 (8) :1663-1669.

Anexo 1

MÉTODO DE FOLLIN-LOWRY

1. Agregar 10 μ L de cada muestra en un tubo de vidrio.
2. Adicionar 100 μ L de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 1 % y 100 μ l de reactivo de cobre.
3. Mezclaron los tubos y dejar en incubación a temperatura ambiente durante 10 min.
4. Adicionaron 400 μ l de reactivo de Follin.
5. Mezclar e incubar en baño serológico por 5 minutos a 55 °C
6. Incubación durante 5 minutos a 4 °C.
7. Leer absorbancias a 610 nm en espectrofotómetro

Anexo 2

PROTOCOLO ACTIVIDAD HEXOSAMINIDASA A

1. De acuerdo a los resultados de la proteína total calcular la cantidad de μ l a tomar de cada una de las muestras para obtener una concentración final de 0,02 mg
2. Completar con agua desionizada para obtener un volumen final de 100 μ l
3. Adiciona 25 μ l de fosfato citrato 0.2 molar
4. Adiciona 25 μ l de sustrato
5. Incuba 37°C por 20 minutos
6. Pasado el tiempo de incubación se para la reacción con 1,35ml de glicina carbonato
7. Lectura en fluorómetro

Anexo 3

PROTOCOLO TRIGLICERIDOS GLICEROL FOSFATO OXIDASA/PEROXIDASA

1. Atemperar el reactivo a temperatura ambiente
2. Pipetear en tubos de ensayo

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón de triglicéridos (S)	----	10 µL	----
Muestra	----	---	10 µL
Reactivo (A)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

3. Agitar bien e incubar los tubos durante 15 minutos a temperatura ambiente (16-25°C) o durante 5 minutos a 37°C
4. Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la muestra a 500 nm frente al blanco. El color es estable durante al menos 2 horas

ANEXO 3

**BIBLIOTECA ALFONSO BORRERO CABAL, S.J.
DESCRIPCIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO**

FORMULARIO

TÍTULO COMPLETO DE LA TESIS DOCTORAL O TRABAJO DE GRADO			
Influencia de la biomasa y la concentración de metanol en la producción de la enzima recombinante Hexosaminidasa A en <i>Pichia pastoris</i>			
SUBTÍTULO, SI LO TIENE			
AUTOR O AUTORES			
Apellidos Completos		Nombres Completos	
Hernández Pulido		Francy Liliana	
DIRECTOR (ES) TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO			
Apellidos Completos		Nombres Completos	
Alméciga Díaz		Carlos Javier QF. Ph.D.	
Rodríguez López		Edwin Alexander	
FACULTAD			
Ciencias			
PROGRAMA ACADÉMICO			
Tipo de programa (seleccione con "x")			
Pregrado	Especialización	Maestría	Doctorado
X			

Nombre del programa académico						
Microbiología Industrial						
Nombres y apellidos del director del programa académico						
Janeth Arias M.S.c.						
TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:						
Microbióloga Industrial						
PREMIO O DISTINCIÓN <i>(En caso de ser LAUREADAS o tener una mención especial):</i>						
CIUDAD		AÑO DE PRESENTACIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO			NÚMERO DE PÁGINAS	
Bogotá, D.C.		2014			46	
TIPO DE ILUSTRACIONES (seleccione con "x")						
Dibujos	Pinturas	Tablas, gráficos y diagramas	Planos	Mapas	Fotografías	Partituras
		X				
SOFTWARE REQUERIDO O ESPECIALIZADO PARA LA LECTURA DEL DOCUMENTO						
<p>Nota: En caso de que el software (programa especializado requerido) no se encuentre licenciado por la Universidad a través de la Biblioteca (previa consulta al estudiante), el texto de la Tesis o Trabajo de Grado quedará solamente en formato PDF.</p>						
MATERIAL ACOMPAÑANTE						

TIPO	DURACIÓN (minutos)	CANTIDAD	FORMATO		
			CD	DVD	Otro ¿Cuál?
Vídeo					
Audio					
Multimedia					
Producción electrónica					
Otro Cuál?					

DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVE EN ESPAÑOL E INGLÉS

Son los términos que definen los temas que identifican el contenido. (En caso de duda para designar estos descriptores, se recomienda consultar con la Sección de Desarrollo de Colecciones de la Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J en el correo biblioteca@javeriana.edu.co, donde se les orientará).

ESPAÑOL	INGLÉS
Hexosaminidasa A	Hexosaminidase A
Modelo cinético	Kinetic model
<i>Pichia pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
Proteína recombinante	Recombinant protein
Rendimiento	Yield

RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS

(Máximo 250 palabras - 1530 caracteres)

En la actualidad la terapia de remplazo enzimático es una alternativa prometedora para el tratamiento de algunos errores innatos del metabolismo. Las enzimas empleadas para este fin son producidas de forma recombinante empleando diversos sistemas de expresión como lo son las bacterias, levaduras y células de animales o plantas. En el caso de las levaduras una de las más empleadas ha sido *Pichia pastoris*, la cual ha mostrado varias ventajas frente a los demás sistemas en cuanto a su productividad. Sin embargo, factores relacionados con las condiciones de cultivo, y concentración de biomasa o inductor tienen efectos importantes sobre la producción de la enzima recombinante. En este sentido, en el presente proyecto se caracterizaron los niveles de

producción de la enzima Hexosaminidasa A producida de forma recombinante en la levadura *P. pastoris*, bajo diferentes concentraciones de biomasa y metanol. Con los resultados obtenidos se construyó un modelo para observar el comportamiento cinético de *Pichia pastoris* con un sustrato limitante. Los resultados mostraron que los mayores valores de actividad enzimática fueron obtenidos con una concentración inicial de glicerol de 4% y con una concentración de metanol del 0,5% durante la fase de inducción. Los resultados obtenidos en el presente trabajo constituyen información importante en el desarrollo de un proceso de producción eficiente de la enzima recombinante Hexosaminidasa A para uso en terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Tay Sachs.

ABSTRACT

At present enzyme replacement therapy is a promising alternative for the treatment of some inborn errors of metabolism. The enzymes employed for this purpose are recombinant produced using various expression systems such as bacteria, yeast and animal or plant cells. In the matter of yeasts one of the most use had been *Pichia pastoris*, this yeast had show many advantages in comparison with others systems talking about productivity. However, factors related to culture conditions and biomass concentration or inductor has important effects on the production of the recombinant enzyme. In this project production levels of hexosaminidase enzyme recombinant produced in yeast *P. pastoris* under different concentrations of biomass and methanol they were characterized. With the results a model was constructed to observe the kinetic behavior of *Pichia pastoris* with a limiting substrate. The results showed that higher enzyme activity values were obtained with an initial concentration of 4% glycerol and with a methanol concentration of 0.5% during the induction phase. The results obtained in this study are important information on the development of an efficient production process of the recombinant enzyme hexosaminidase A for use in enzyme replacement therapy for Tay Sachs.