



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Estudio de la producción de una proteína molde para consumo humano con promotores regulados por glucosa en *Pichia pastoris*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

IBT. LUIS ADRIÁN SANTAMARÍA GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. GABRIEL DEL RIO GUERRA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. AGUSTÍN LOPEZ-MUNGUÍA CANALES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DR. LEOBARDO SERRANO CARREÓN
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Ciudad de México. Abril 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme una formación académica y humana de excelencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca para estudios de maestría (No. de becario 762737) así como al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, proyecto IT200320, por su apoyo económico para realizar este trabajo y al posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM por su apoyo administrativo en el proyecto.

Al Dr. Gabriel del Río Guerra, por su apoyo en los experimentos iniciales del proyecto. Por la asesoría, consejos y tiempo otorgado durante mi formación en el posgrado y también por compartir su experiencia, creatividad y entusiasmo para hacer Ciencia.

A los miembros del comité tutor, el Dr. Agustín López-Munguía y el Dr. Leobardo Serrano, por aportar ideas, reflexiones y consejos las cuales fueron de gran relevancia para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. María Teresa Lara Ortiz, por su amabilidad y disponibilidad para brindar apoyo técnico en los experimentos y por su aportación de valiosas ideas para el proyecto.

A mis padres, por su apoyo incondicional e inspirarme a ser mejor persona cada día, les estaré siempre agradecido:

A mi mamá, por siempre creer en mí y no dejarme desistir, por mostrarme cada día el valor del trabajo, el orden y la disciplina.

A mi papá, por enseñarme la virtud de la paciencia, la amabilidad y la dedicación a todo lo que haga.

A mi hermano y la pequeña Andrea, que aun estando lejos, con una sonrisa los recuerdo y siempre me acompañan.

A toda mi familia que muestran siempre su apoyo a mi esfuerzo y cuento con ellos en las buenas y en las malas, muchas gracias.

A la familia que elegí, mis amigos de la vida, que a pesar del aislamiento siempre me acompañaron en esta incierta pero siempre gratificante búsqueda científica. Sam, Gaby, Arturo, Erika, Marce y muchos más.

A quienes vienen y van, y dejan huella de alguna manera.

CONTENIDO

RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
MARCO TEÓRICO.....	12
Función e importancia nutricional de las proteínas en el cuerpo humano.	12
Aminoácidos esenciales y no esenciales.....	13
Requerimiento y calidad nutricional de proteínas.....	14
Efectos fisiológicos asociados a una dieta no balanceada en contenido de proteína y EAA.....	16
Sistemas actuales de producción de proteína de origen animal para consumo humano.....	18
Agricultura celular como alternativa de producción de proteína para consumo humano.....	21
Células de animales.....	21
Células vegetales.....	21
Células bacterianas.....	22
Proteínas sintéticas.....	23
Expresión de proteínas recombinantes en <i>Pichia Pastoris</i>	25
ANTECEDENTES.....	26
Producción de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i> con promotores alternativos regulados por glucosa.	27
El promotor P _{GAP}	27
El promotor P _{GTH1}	28
Efecto de los parámetros de operación en la producción de proteína recombinante.....	29
Medio de cultivo.....	29
Concentración de oxígeno disuelto (C _{DO}) o condiciones de transferencia de oxígeno.	31
pH del medio de cultivo.....	32
Temperatura.....	32
JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVOS.....	35
General.....	35
Específicos.....	35

MÉTODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	36
Expresión heteróloga de la proteína de colágeno tipo XII nativa de <i>Bos taurus</i> en <i>Pichia pastoris</i> con los promotores pGAP y pGTH1 en tubos de ensayo.	36
Cultivo de la cepa de <i>Pichia pastoris</i> que contiene el vector que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP en matraces agitados.	37
Variación de las condiciones iniciales del cultivo para la evaluación de la producción de proteína soluble total.	37
Evaluación del efecto de la oxigenación del cultivo en la secreción de PCT12.	38
Cultivos con medio mínimo suplementado.	39
Cuantificación de proteína soluble total y de PCT12 en el sobrenadante.	39
Cuantificación de glucosa.	40
Electroforesis en gel desnaturalizante y tinción de plata	40
Extracción de proteína intracelular	41
Precipitación de proteína total con TCA	41
Western blot.....	42
RESULTADOS	43
Cultivo de cepas transformantes de <i>Pichia pastoris</i> con plásmidos que expresan la PCT12 bajo los promotores GAP o GTH1 en tubo de ensayo.	43
Electroforesis en gel y tinción en plata.....	44
Efecto de las condiciones iniciales en la producción de proteína soluble total de la cepa transformante que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP.	45
Efecto de la oxigenación en cultivos de la cepa transformante de <i>Pichia pastoris</i> con el plásmido que expresa la proteína PCT12 bajo el promotor GAP en matraces agitados.	48
Cultivos con mayor oxigenación (O ₂ +).....	48
Cultivos en condiciones de menor oxigenación	49
Western blot de proteína intracelular	50
Cultivos suplementados con casaminoácidos.....	52
Cultivos suplementados con casaminoácidos en oxigenación moderada.....	52
.....	54
DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES	64
PERSPECTIVAS	65
BIBLIOGRAFÍA.....	66

ANEXOS.....	75
Anexo 1.....	75
Anexo 2.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Ejemplos de algunas funciones de las proteínas en los organismos vivos. (Fuente: http://www.informatics.jax.org/vocab/gene_ontology).....	12
Tabla 2 Requerimientos diarios recomendados de aminoácidos esenciales para adultos. (WHO, 2007).....	16
Tabla 3 Metodología para la tinción de plata de gel de poliacrilamida.....	41
Tabla 4 Comparación de rendimientos de las cepas con los promotores GTH1 y GAP cultivadas en tubos de ensayo.....	44
Tabla 5 Comparación de la producción específica de proteína soluble por la variación de parámetros de temperatura, fuente de carbono y biomasa inicial.....	45
Tabla 6 Comparación de cultivos con cepas productoras de PCT12 con el promotor GAP en tubo de ensayo y matraz agitado.....	47
Tabla 7 Ejemplos de proteínas recombinantes expresadas en <i>Pichia pastoris</i>	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Balance de nitrógeno en el metabolismo de proteínas. Hay una constante pérdida de nitrógeno en el cuerpo debido al recambio proteico, orina, heces y crecimiento de uñas, cabello, la piel que se desprende del cuerpo, etcétera, por lo que se debe de tener una adecuada ingesta de proteínas en la dieta para mantener este balance. (Figura adaptada de WHO, 2007).	14
Figura 2. Comparativa del impacto ambiental de la industria alimentaria en el año 2010 y proyectada para el año 2050 sobre 5 rubros ambientales: Emisiones de gases de efecto invernadero (GHG), uso de suelo, uso de agua, fijación de nitrógeno y fósforo en el suelo. Cada grupo alimentario se representa en distintos colores; Rojo: Productos de origen animal, Amarillo: Cultivos de alimentos básicos (arroz, trigo, maíz), Verde: frutas y vegetales, Azul: aceites vegetales, Gris: Azúcar, Negro: otros cultivos. Figura obtenida de Springmann et al., 2018.....	18
Figura 3. Contribución de emisiones de gases de efecto invernadero de distintas partes del proceso de producción para varios productos alimentarios. Figura tomada de Poore & Nemecek, 2018	20
Figura 4. Diagrama de la producción de leche a base de lacto-globulina recombinante. La proteína obtenida por vía fermentativa es formulada junto con grasas, carbohidratos y micronutrientes que aportan las características nutricionales y organolépticas de la leche natural. SCFAs: Ácidos grasos de cadena corta; HOSO: ácido oleico de girasol. Figura adaptada de Pandya et al., 2017.	24

Figura 5 . Resultados de la búsqueda en bases de datos SwissProt de proteínas que cumplen con los requerimientos de EAA recomendados. Se muestra el número de sustituciones de aminoácidos necesarias en la composición nativa de la proteína para cumplir con la RDA, además del porcentaje de cambio que estas sustituciones representan en la composición total de AA de la proteína. Figura tomada de Mendoza-Cabrera, 2020.	27
Figura 6 . Parámetros operacionales para procesos de alta productividad de distintas proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i> bajo un sistema de cultivo en lote alimentado. Figura tomada de Looser et al., 2015.	28
Figura 7 . SDS-PAGE con tinción Coomassie mostrando la proteína heteróloga secretada EDIII (Dominio del serotipo 3 del virus del dengue) en medio de cultivo BMM con distintas concentraciones de casaminoácidos (%CA) (Kaushik et al., 2016).	30
Figura 8 . Cultivo en lote alimentado de <i>P. pastoris</i> con adición de aminoácidos precursores, 30 °C, pH 5.0. La mezcla de aminoácidos (ácido glutámico, cisteína y glicina) se añadió a las 44 h de cultivo (Fei et al., 2009).....	31
Figura 9 . Efecto del pH en el crecimiento celular y producción de lipasa recombinante en <i>P. pastoris</i> con el promotor GAP (Wang et al., 2012)	32
Figura 10 . Efecto de la temperatura en el crecimiento celular de <i>P. pastoris</i> y la producción de Lipasa recombinante. Wang et al., 2012.....	33
Figura 11 . Vector pGAPZ α A utilizado para expresar la PCT12 bajo el promotor GAP; para la expresión de PCT12 bajo el promotor GTH1 se utilizó este mismo vector sustituyendo el promotor GAP con el promotor GTH1.....	36
Figura 12 . Cinética de crecimiento celular (líneas continuas) y concentración de proteína soluble total (PST) en el sobrenadante (líneas discontinuas) de cultivos de cepas transformadas de <i>Pichia pastoris</i> que expresan la PCT12 con el plásmido que contiene el promotor GAP (líneas azules) o el promotor GTH1 (líneas rojas). Cepa control nativa (líneas verdes).....	43
Figura 13 . SDS-PAGE de muestras del sobrenadante a las 72 horas de cultivo. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Control, Carril 3: Cepa transformada con promotor GAP y Carril 4: Cepa transformada con promotor GTH1. La flecha roja señala una banda observada a un peso molecular aproximado de 8 kDa.	44
Figura 14. A) Cinética de crecimiento celular, B) consumo de fuente de carbono, C) concentración de proteína soluble total en sobrenadante y D) producción específica de proteína soluble total de cultivos de la cepa de <i>Pichia pastoris</i> que contiene el plásmido que expresa la proteína PCT12 bajo el promotor constitutivo GAP en matraces agitados. Condiciones: 25 °C, 240 rpm, Fuente de carbono inicial =30 g/L, D.O. inicial= 0.1 U.A.	46
Figura 15. A) SDS-PAGE de sobrenadante de cultivos de <i>P. pastoris</i> transformada con el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP con mayor oxigenación (O ₂ +). Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: vacío; carriles 3-6: cultivo con mayor oxigenación; carriles 7-10: cultivo en normoxia. B) Cinética de	

crecimiento celular con mayor oxigenación **C)** cinética de crecimiento en normoxia. Condiciones de cultivo: medio mínimo SC 3%, 25 ° C y 240 rpm. 48

Figura 16. A) SDS-PAGE de sobrenadante de cultivos de *P. pastoris* que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP en menor oxigenación moderada (O₂-) y menor oxigenación aumentada (O₂- -); **Carril 1:** Marcador de peso molecular, **carril 2:** vacío; **carriles 3-6:** cultivos en condición de menor oxigenación moderada **carriles 7-10:** cultivos en condición de menor oxigenación elevada, **B)** cinética de crecimiento en menor oxigenación moderada **C)** cinética de crecimiento en menor oxigenación aumentada. Condiciones de cultivo: medio mínimo SC 3%, 25 ° C, 240 rpm. 49

Figura 17. SDS-PAGE de sobrenadante de cultivos de *P. pastoris* cepa nativa. Carril 1: Marcador de peso molecular, **carriles 2-4:** cultivo en normoxia; **carriles 5-7:** cultivo en menor oxigenación moderada **carriles 8-10:** cultivo en normoxia + cas aminoácidos. Condiciones de cultivo: 25 °C, 240 rpm. Medio mínimo SC 3%. 50

Figura 18. A) Análisis por SDS-PAGE y **B)** Western Blot de proteína soluble total en el sobrenadante y proteína intracelular de *P. pastoris* transformada con el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP (pGAP) a las 36 horas de cultivo. 51

Figura 19. Cultivos en normoxia de *P. pastoris* que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP A) SDS-PAGE de sobrenadante; **carril 1:** Marcador de peso molecular, **carril 2:** vacío, **carriles 3 a 6:** muestras. **B)** Western blot de proteína intracelular. **C)** Cinética de crecimiento celular. **D)** Proteína soluble total en el sobrenadante. **E)** PCT12 en el sobrenadante. **F)** Producción específica de PCT12 por gramo de células. Condiciones de cultivo: medio mínimo SC 3% + 1% casaminoácidos, 25 ° C, 240 rpm..... 53

Figura 20. Cultivos en menor oxigenación de *P. pastoris* que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP A) SDS-PAGE de sobrenadante; **carril 1:** Marcador de peso molecular, **carril 2:** vacío, **carriles 3 a 8:** muestras. **B)** Western blot de proteína intracelular. **C)** Cinética de crecimiento celular. **D)** Proteína soluble total en el sobrenadante. **E)** PCT12 en el sobrenadante. **F)** Producción específica de PCT12 por gramo de células. Condiciones de cultivo: medio mínimo SC 3% + 1% casaminoácidos, 25 ° C, 240 rpm. 54

Figura 21. Western blot de muestras del sobrenadante concentradas con TCA de cultivos de *P. pastoris* que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP. Carriles 2-6: Cultivos en menor oxigenación; **Carriles 7-9:** Cultivos en normoxia. Condiciones de cultivo: medio mínimo SC 3% + 1% cas aminoácidos, 25 ° C, 240 rpm 55

NOMENCLATURAS Y ABREVIATURAS

° C: grados centígrados
μ: velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
μL: microlitros
AgNO₃: nitrato de plata
AA: aminoácidos
BSA: albúmina de suero bovino
BSM: Basal Salt Medium
CLA: cultivo en lote alimentado
CA: casaminoácidos
C_{DO}: concentración de oxígeno disuelto
Da: Daltones
DNA: ácido desoxirribonucleico
D.O.: densidad óptica
EAA: aminoácidos esenciales
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ERAD: degradación asociada al retículo endoplásmico
Fab: fragmento de anticuerpo
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
g: gramos
GAP: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GHG: gases de efecto invernadero
GRAS: generalmente reconocido como seguro
HCl: ácido clorhídrico
HRP: peroxidasa de rábano
HSA: albúmina de suero humano
h: hora
IgG: inmunoglobulina tipo G
IDR: ingesta diaria recomendada
kDa: kilo Daltones
L: litros
M: molar
mL: mililitros
mM: milimolar
mg: miligramos
mRNA: RNA mensajero
nm: nanómetros
NaCO₃: Carbonato de sodio
NaOH: hidróxido de sodio
Na₂S₂O₃·5H₂O: tiosulfato de sodio pentahidratado
NEAA: aminoácidos no esenciales
NIH: Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos
RE: retículo endoplásmico
RDA: ingesta diaria recomendada de aminoácidos esenciales
PCT12: proteína de colágeno tipo XII
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PST: proteína soluble total

P_{AOX1}: promotor del gene de la alcohol oxidasa I
P_{GAP}: promotor del gene de la gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa
P_{GTH1}: promotor del gene del transportador de glucosa de alta afinidad
RNA: ácido ribonucleico
rpm: revoluciones por minuto
SC: Synthetic Complete
SCP: Single Cell Protein
SDS: dodecil sulfato de sodio
U.A.: unidades de absorbancia
UPR: respuesta a proteínas mal pegasadas
UV-Vis: Ultravioleta-Visible
OGM: organismos genéticamente modificados
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
TCA: ácido tricloroacético
TBS: Solución salina amortiguada con Tris
TEMED: Tetrametiletilendiamina
Tris: tris(hidroximetil)aminometano
U.A.: unidades de absorbancia
V: volt
YNB: Base de nitrogeno de levadura
YPD: Yeast extract Peptone Dextrose
WHO: Organización Mundial de la Salud
WT: nativa

A: alanina
C: cisteína
D: aspártico
E: ácido glutámico
F: enilalanina
G: glicina
H: histidina
I: isoleucina
K: lisina
L: leucina
M: metionina
N: asparagina
P: prolina
Q: glutamina
R: ariginina
S: serina
T: treonina
V: valina
W: triptófano
Y: tirosina

RESUMEN

El aspecto más importante de las proteínas desde un punto de vista nutricional es su composición de aminoácidos. Los aminoácidos son indispensables para la vida y su consumo resulta fundamental no sólo como aporte de energía sino también para el buen funcionamiento del sistema inmunológico y la reparación de tejidos. La ingesta de proteínas de calidad con aminoácidos esenciales (EAA) que el cuerpo no puede sintetizar es de suma importancia debido a que son los sustratos clave para preservar o ganar masa muscular y para asegurar la síntesis de proteínas requeridas por el organismo. Por otro lado la Organización Mundial de la Salud establece las proporciones óptimas de EAA en la ingesta diaria humana (RDA) sin embargo actualmente no existe reporte alguno sobre una proteína natural o sintética que cumpla con la ingesta diaria recomendada de EAA. Una proteína con esta composición además de tener un impacto nutricional podría resultar en costos más asequibles y un menor uso de suelo en los sistemas de producción actuales. Partiendo de lo anterior y como antecedente de este proyecto, en el Instituto de Fisiología Celular se llevó a cabo la búsqueda de proteínas que satisfacen la ingesta diaria recomendada de EAA, como resultado de un análisis exhaustivo en bases de datos, se eligió la proteína cadena alfa-1 de colágeno tipo XII (PCT12) y se expresó en la levadura *Pichia pastoris*. En este trabajo se evaluó la producción de la PCT12 utilizando una cepa de *P. pastoris* transformada con un vector que contiene el promotor del gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAP) el cual es activado por glucosa. También se evaluó la expresión de la PCT12 bajo un promotor del gen de transportador de glucosa de alta afinidad (GTH1) el cual es activado en condiciones de limitación de glucosa. Para optimizar la producción de la proteína se probaron distintas condiciones de cultivo y se encontró que, al cultivar la cepa con el promotor GAP en matraces agitados a 240 RPM con 50 mL de medio mínimo SC suplementado con casaminoácidos y una temperatura de 25 °C se obtiene mayor cantidad de PCT12 en el sobrenadante. La expresión de la proteína fue analizada mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE) y detectada con un anticuerpo monoclonal. El análisis por densitometría de SDS-PAGE mostró una concentración de 2.9 mg/L de PCT12 en el sobrenadante que representa ~ 13% de la proteína soluble total después de 72 horas de cultivo. Adicionalmente, los análisis por inmuno-detección sugieren que gran parte de la proteína recombinante es retenida intracelularmente generando distintas formas modificadas. La expresión de la PCT12 bajo el promotor constitutivo GAP mostró la utilidad de este sistema para expresar una proteína recombinante, sin embargo, deben considerarse factores a mejorar en el procesamiento y secreción de la proteína bajo este sistema de expresión. Adicionalmente, se sugiere el uso del promotor inducido por metanol AOX1 debido a que posiblemente la producción de proteína recombinante con el promotor GAP compite con el crecimiento celular.

ABSTRACT

An important aspect of proteins from a nutritional point of view is its amino acids composition. Amino acids are essential for life and its consumption results not only as a source of energy but also they contribute to proper functioning of immunological system and tissues regeneration. Intake of quality proteins with essential amino acids (EAA), which our body cannot synthesize, is important since EAA are key substrates to preserve or to gain muscular mass and also to synthesize proteins required by the organism. On the other hand, the World Health Organization establish optimal proportions for daily human intake of EAA, however currently there is no report of a natural or synthetic protein that meet this recommended EAA intake. A protein with this amino acid composition would have a nutritional impact, affordable cost and less land use in comparison of actual protein production systems. Considering the above, in a previous work at Instituto de Fisiología Celular, a search of a protein that meet the criteria of daily recommended EAA intake was made. The type XII collagen protein (PCT-12) was chosen as a result of this exhaustive bioinformatics analysis of proteins database and this protein was expressed in the yeast *P. pastoris*. In this work the production of PCT-12 was evaluated using a transformed strain of *P. pastoris* with the glucose regulated promoter from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GAP). Also PCT12 expression was evaluated under control of high affinity glucose transporter gene promoter (GTH1), which is activated in glucose limiting conditions. In order to optimize the protein production several culture conditions were evaluated and it was found that using the strain with the GAP promoter, a lower culture temperature, moderate agitation (240 rpm) and supplemented culture media with casaminoacids, increases the PCT12 concentration in supernatant. Expression of recombinant protein was evaluated by gel electrophoresis (SDS-PAGE) and detected with a monoclonal antibody by western blot. The SDS-PAGE analysis showed a PCT12 concentration of 2.9 mg/L in supernatant which represents about 13% of total soluble protein in supernatant after 72 hours of fermentation. Additionally, immunoblotting analysis suggest that most part of recombinant protein is maintained intracellularly generating several modified recombinant proteins forms. Expression of PCT12 under GAP promoter showed the aptitude of this system to produce this recombinant protein, however additional factors must be considered in order to improve the intracellular processing and secretion of PCT12 with this promoter. It is suggested the use of methanol induced promoter AOX1 for there is probably a competition between cellular growth and recombinant protein production.

MARCO TEÓRICO

Función e importancia nutricional de las proteínas en el cuerpo humano.

Las proteínas son biopolímeros de aminoácidos (AA), unidos por enlaces peptídicos que de acuerdo a la clase de aminoácidos presentes y el orden en el que están dispuestos en la proteína, desempeñan distintas funciones en el cuerpo humano (Alberts et al., 2002); De esta manera, las proteínas se clasifican funcionalmente como: anticuerpos, enzimas, proteínas mensajeras (hormonas) y componentes estructurales (Tabla 1). Esta última función es de especial relevancia ya que son uno de los principales componentes estructurales de las células y tejidos (aparte del agua) constituyendo de 14 a 16 % de la masa corporal humana (Duda et al., 2019).

Por otra parte los aminoácidos libres (que entran al cuerpo en forma de proteínas y subsecuentemente son hidrolizadas por enzimas en el proceso de digestión) tienen un papel importante en el metabolismo primario y la formación de compuestos nitrogenados (Massey et al., 1998). Adicionalmente los esqueletos de carbono de las moléculas de algunos aminoácidos funcionan como intermediarios en la glicolisis, gluconeogénesis y el ciclo de Krebs, por lo tanto, son utilizados como fuente de energía cuando los carbohidratos o los ácidos grasos se han agotado (Cahill, 2006).

Tabla 1 Ejemplos de algunas funciones de las proteínas en los organismos vivos.
(Fuente: http://www.informatics.jax.org/vocab/gene_ontology)

Función	Descripción	Ejemplo
Inmunológica	Los anticuerpos se unen a partículas externas tales como virus y bacterias para proteger el cuerpo humano.	Inmunoglobulina G (IgG)
Catalítica	Las enzimas catalizan miles de reacciones químicas celulares.	Fenilalanina hidroxilasa
Comunicación	Constituyen ciertos tipos de hormonas que coordinan procesos biológicos entre células, tejidos y órganos.	Hormona del crecimiento
Transporte/ Almacenamiento	Estas proteínas se unen y transportan pequeñas moléculas dentro de la célula y el cuerpo humano.	Ferritina
Fuente energética	A partir de la digestión de proteínas algunos aminoácidos se metabolizan para proporcionar energía a la célula	Aminoácidos con grupos alifáticos: Leucina y Valina
Estructural	Estas proteínas proveen estructura y soporte a la célula.	Actina

Aminoácidos esenciales y no esenciales

Se han descrito alrededor de 1000 aminoácidos en la naturaleza pero solo de 20 a 22 de estos son biosintetizados y juegan un papel central en el metabolismo de los seres vivos además de ser los componentes principales de las proteínas (Rodgers et al., 2017). Por otra parte, los organismos presentan diferencias en cuanto a su capacidad de sintetizar estos aminoácidos, tal es el caso de muchas bacterias y plantas, que pueden sintetizar la mayoría de sus metabolitos nitrogenados a partir de una única fuente de nitrógeno como el amoníaco o el nitrato (Guedes et al., 2011; Price et al., 2018). En el caso del ser humano, este puede sintetizar aproximadamente la mitad de los aminoácidos en las cantidades necesarias para su crecimiento por lo que el resto de los aminoácidos deben adquirirse por medio de los alimentos (Guedes et al., 2011).

A través de ensayos de monitoreo de crecimiento en animales y de balance de nitrógeno, los aminoácidos se han clasificado en esenciales y no esenciales. Los aminoácidos que son sintetizados por los tejidos se denominan aminoácidos no esenciales (NEAA)(Wu, 2009; Wu et al., 2014) y son los siguientes: alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, prolina, serina y tirosina; Estos aminoácidos se sintetizan con facilidad a partir de metabolitos abundantes, como intermediarios de la glucólisis o del ciclo del ácido cítrico (Mathews et al., 2013).

Por otra parte los aminoácidos cuyos esqueletos de carbono no pueden ser sintetizados *de novo* por el organismo y por tanto deben ser provistos en la dieta se denominan aminoácidos esenciales (EAA) (Wu et al., 2014) los cuales incluyen: histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptófano (Trp) y valina (Val); De manera general los EAA tienen estructuras complejas como anillos aromáticos y cadenas laterales hidrocarbonadas (Mathews et al., 2013).

La proteína se requiere en la alimentación como fuente de EAA y del nitrógeno necesario para la síntesis *de novo* de NEAA y de otros compuestos que contienen nitrógeno. La síntesis proteica solo puede ocurrir cuando se dispone fácilmente de la totalidad de los aminoácidos para la formación de polipéptidos. La fuente inmediata de aminoácidos para la síntesis proteica es la reserva corporal de aminoácidos liberados por la degradación de proteínas corporales (recambio proteico), de aquellos sintetizados por rutas bioquímicas y de aquellos proporcionados por la digestión de proteínas de la dieta (Bender & Mayes, 2012).

Requerimiento y calidad nutricional de proteínas

Un modelo general del requerimiento de proteínas en la dieta (y como en cualquier otro nutriente), se define en términos de las necesidades del organismo (demanda metabólica) y las cantidades dietéticas que satisfacen estas necesidades (eficiencia de utilización), entonces se define:

$$\text{Requerimiento dietético} = \text{demanda metabólica} / \text{eficiencia de utilización}$$

La demanda metabólica comprende todos aquellos procesos que consumen AA y da lugar a pérdidas urinarias, fecales y otras que incluyen componentes de síntesis proteica como la piel, el cabello y secreciones (WHO, 2007). El requerimiento dietético proteico es la cantidad de proteínas o sus AA constitutivos que deben ser suministrados para satisfacer las demandas metabólicas y de esta manera alcanzar el equilibrio de nitrógeno. En la mayoría de los casos el requerimiento será mayor que la demanda metabólica debido a la eficiencia de utilización de la proteína que tiene como factores asociados la digestión, absorción, digestibilidad y biodisponibilidad de los AA absorbidos (Tomé, 2018; WHO, 2007). Existen distintos métodos para estimar el requerimiento humano de nitrógeno, usualmente se ha determinado mediante el equilibrio de nitrógeno que se plantea en términos de entradas y pérdidas de nitrógeno, y se determina el valor de entrada de nitrógeno para que el balance sea igual a cero (Fig.1) (Tomé & Bos, 2000); para esto se considera que la proteína es por mucho la sustancia con mayor contenido de nitrógeno y que el nitrógeno del cuerpo humano (de un adulto joven) se mantiene constante o puede incrementar (crecimiento en la infancia) si la entrada dietética de AA es adecuada. Entonces, si el nitrógeno corporal disminuye o no se incrementa adecuadamente, entonces la dieta es deficiente. (WHO, 2007).

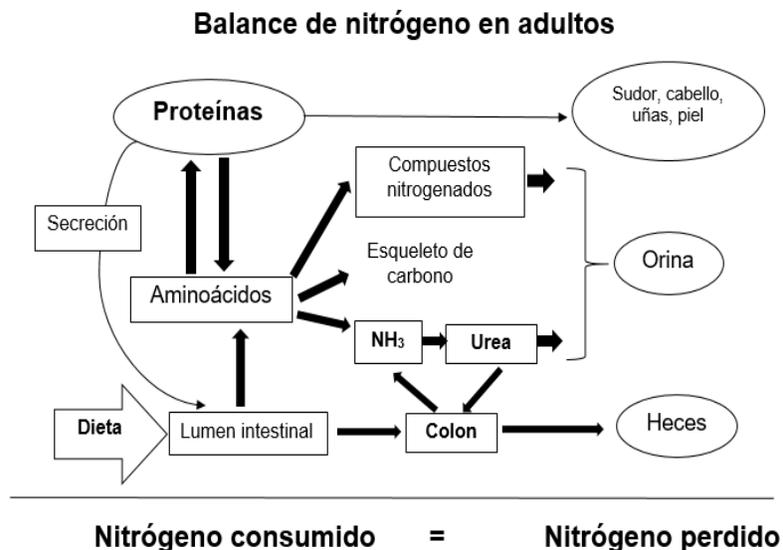


Figura 1. Balance de nitrógeno en el metabolismo de proteínas. Hay una constante pérdida de nitrógeno en el cuerpo debido al recambio proteico, orina, heces y crecimiento de uñas, cabello, la piel que se desprende del cuerpo, etcétera, por lo

que se debe de tener una adecuada ingesta de proteínas en la dieta para mantener este balance. (Figura adaptada de WHO, 2007).

Por otra parte, la utilización de la proteína de la dieta depende no solo de la cantidad de proteína disponible sino también su digestibilidad y su calidad. La digestibilidad es definida en términos del balance de AA a través del sistema gastrointestinal puesto que la diferencia entre la entrada y salida de AA provee una medida del grado de absorción y digestión de las proteínas de los alimentos como aminoácidos para su uso en el cuerpo humano; en otras palabras es la cantidad de AA ingeridos disponibles para el organismo después de su digestión y absorción (WHO, 2007).

La calidad de la proteína se refiere a la concentración de EAA en un determinado alimento en relación a sus concentraciones en moléculas proteicas que se están sintetizando o el requerimiento humano de ellas, en otras palabras, la calidad de la proteína es una medida de que tan bien el perfil de AA absorbidos coincide con el requerimiento metabólico. En general, las proteínas de los alimentos de origen animal están más próximas en composición de aminoácidos a las proteínas humanas que las de los alimentos de origen vegetal (Bender & Mayes, 2012).

Considerando los aspectos anteriores, se ha determinado un requerimiento proteico promedio estimado para adultos sanos de 0.83 g/kg al día, este valor considera la variabilidad entre individuos, que cubre el requerimiento del 97.5 % de la distribución poblacional. (Rand et al., 2003; WHO, 2007). Sin embargo este valor varía en casos de mujeres embarazadas (Kalhan, 2000) y lactantes, además de niños y adultos mayores, quienes requieren consumir una cantidad adicional de proteína para satisfacer sus necesidades metabólicas. De manera similar se estimó la ingesta diaria recomendada de EAA (RDA) en adultos (Tabla 2).

Sin embargo, se debe tomar en cuenta la importancia del consumo de péptidos o proteínas intactas sobre el consumo de aminoácidos libres o hidrolizados de proteínas, pues se ha observado que la ingesta de EAA libres induce colitis (Souza et al., 2017). Además el proceso de digestión gastrointestinal de las proteínas intactas permite liberar péptidos bioactivos que promueven la saciedad (Caron et al., 2017). Adicionalmente, las proteínas intactas tienen un papel fundamental en la estimulación de proteínas musculares (Katsanos et al., 2008).

Tabla 2 Requerimientos diarios recomendados de aminoácidos esenciales para adultos. (WHO, 2007).

Aminoácido esencial	mg/kg por día	mg/g proteína
Histidina	10	15
Isoleucina	20	30
Leucina	39	59
Lisina	30	45
Metionina	10	16
Fenilalanina	25	38
Treonina	15	23
Triptófano	4	6
Valina	26	39

Efectos fisiológicos asociados a una dieta no balanceada en contenido de proteína y EAA.

La epidemiología nutricional ha mostrado la importancia de la ingesta de proteínas para mantener el funcionamiento cerebral en la población de adultos mayores. Comparados con pacientes sanos, los pacientes con demencia senil tienen una ingesta de proteínas significativamente menor (Sanders et al., 2018). En un estudio en ratones seniles alimentados con una dieta baja en proteínas, esta causó anormalidades en el comportamiento: agitación, hiperactividad y bajas concentraciones de ácido gamma-amino butírico, glutamato, glicina, dopamina, norepinefrina, serotonina y aspartato en el cerebro. De manera interesante la administración oral de EAA a estos ratones, revirtió estos comportamientos y restauró la concentración de glutamato cerebral (Sato et al., 2020). Por otra parte, observaciones recientes muestran que mejorando la calidad y la cantidad de ingesta proteica, combinada con actividad física en adultos mayores, pueden contrarrestar la sarcopenia, un proceso pato-fisiológico relacionado con la pérdida progresiva de masa y función muscular (Boirie, 2009; Paddon-Jones & Leidy, 2014), sin embargo se debe considerar primero mejorar la calidad de las proteínas en la dieta antes de la cantidad, debido a una función renal disminuida en este grupo de edad (Boirie, 2009).

Por otro lado, las dietas con alto contenido en proteína, por arriba de la ingesta dietética recomendada (IDR) han sido promovidas de manera intensiva por la industria de suplementos alimenticios a muchos atletas para ganancia muscular o pérdida de peso. Sin embargo existe evidencia de que el uso excesivo de suplementos o un consumo dietético alto en proteínas puede causar desordenes en la salud (Delimaris, 2013). Una dieta con alto contenido en proteína genera una gran cantidad de ácido úrico en los fluidos corporales. Los riñones responden a este exceso de ácido con la excreción neta de ácido en la orina, simultáneamente, el

esqueleto provee amortiguador por medio de resorción ósea resultando en una excesiva pérdida de calcio. La pérdida ácida inhibe también la reabsorción de calcio causando hipercalciuria y pérdida del tejido óseo (Barzel & Massey, 1998). Una baja ingesta de líquidos, combinado con un exceso de consumo proteico, son factores de riesgo para que se presenten cálculos renales, puesto que las fuentes animales de proteínas son fuentes de purinas que son precursoras del ácido úrico, un consumo excesivo de proteína de origen animal puede causar hiperuricosuria, una condición que causa la formación de cálculos de ácido úrico (Hainer et al., 2014). El consumo elevado de carne en la dieta se ha asociado significativamente con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer como lo son colorrectal, mamario, pulmonar, endometrial y tiroideo. Se ha observado que esta relación está particularmente asociada con el consumo de carne roja o carne procesada (Lippi et al., 2016). Los posibles mecanismos de estas patologías involucran la formación de aminas heterocíclicas e hidrocarburos cíclicos aromáticos cuando la carne es cocinada, los cuales se consideran mutagénicos (NIH, 2017).

Adicionalmente, existen enfermedades congénitas asociadas al metabolismo de los aminoácidos (Aliu et al., 2018). Por ejemplo, la fenilcetonuria es una enfermedad de tipo hereditaria que se caracteriza por una deficiencia en el metabolismo del AA fenilalanina, debido a una mutación en la enzima fenilalanina-hidroxilasa que es requerida para metabolizar la fenilalanina a tirosina. Esta condición se asocia con un fenotipo anormal que incluye problemas en el crecimiento, microcefalia y discapacidad intelectual causada por la acumulación de subproductos tóxicos de la fenilalanina (Williams et al., 2008). El tratamiento para este tipo de enfermedades requiere que los pacientes reduzcan la ingesta de algunos aminoácidos en su dieta; en el caso particular de la fenilcetonuria consiste en una dieta restrictiva con bajo contenido en fenilalanina y los alimentos como huevo, leche, queso, carne y legumbres que tienen una cantidad elevada de proteína son excluidos de la dieta. Sin embargo este régimen alimenticio no provee suficiente proteína para los requerimientos de crecimiento, por lo que se necesitan consumir suplementos de EAA sin fenilalanina de manera regular (Michals, 2001; van Wegberg et al., 2017).

Sistemas actuales de producción de proteína de origen animal para consumo humano.

En el año 2018 se estimó una producción global total de 336 millones de toneladas de carne animal para consumo humano provenientes principalmente de China, la Unión Europea, Estados Unidos y Brasil, entre los varios sub-sectores cárnicos, la carne de bovino (referente a la derivada de mamíferos rumiantes como la vaca y el buey) registró la mayor expansión (+2.1 %) seguida por la carne de ave (+1.3 %) respecto al año 2017, lo anterior debido a la demanda creciente de los consumidores por este tipo de productos cárnicos (FAO, 2018).

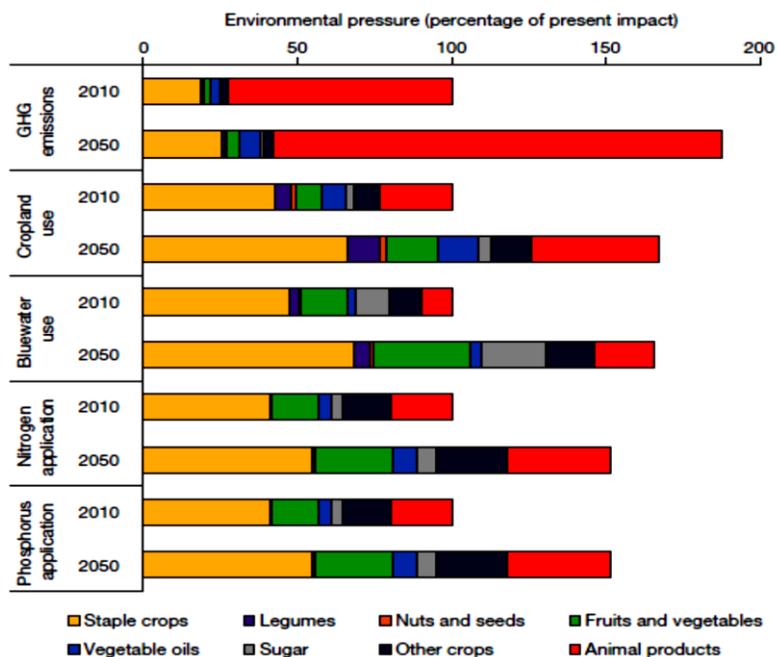


Figura 2. Comparativa del impacto ambiental de la industria alimentaria en el año 2010 y proyectada para el año 2050 sobre 5 rubros ambientales: Emisiones de gases de efecto invernadero (GHG), uso de suelo, uso de agua, fijación de nitrógeno y fósforo en el suelo. Cada grupo alimentario se representa en distintos colores; Rojo: Productos de origen animal, Amarillo: Cultivos de alimentos básicos (arroz, trigo, maíz), Verde: frutas y vegetales, Azul: aceites vegetales, Gris: Azúcar, Negro: otros cultivos. Figura obtenida de Springmann et al., 2018.

Por otro lado, se estima que la población mundial se incrementará casi 35% en las siguientes tres décadas, principalmente en países en vías de desarrollo. Con este aumento poblacional y en combinación con estándares de vida crecientes, se espera que derive en una mayor demanda de proteína derivada de animales. También debe considerarse que los hábitos alimentarios de las personas en países en vías de desarrollo están cambiando de una dieta basada principalmente en granos hacia dietas con una mayor cantidad de proteína (Lynch et al., 2018; Poore & Nemecek, 2018). Por ejemplo, en Asia el consumo de proteína animal per cápita se incrementó 225 % entre los años 1961 y 2011, mientras que el consumo de

proteína a base de cultivos de maíz incrementó solo 22 % en el mismo periodo (Lynch et al., 2018). De manera global, se estima que el 40% de la proteína total consumida por la población es de origen animal y este porcentaje continuará aumentando. De acuerdo a la FAO en el año 2021 estimó que para el año 2030 la producción anual de carne será alrededor de 371 millones de toneladas anuales, de las cuales 41% representará carne de pollo debido a su demanda por su bajo precio respecto a otro tipo de carne, seguido de carne de puerco (34%), carne de res (20%) y carne de cordero (5%) (FAO, 2021).

En un estudio realizado por Springmann y colaboradores se evaluó el impacto ambiental de la industria alimentaria en 5 rubros que incluyen: emisiones de gases de efecto invernadero (GHG), uso de suelo para cultivo, uso de recursos hídricos, así como fijación de nitrógeno y fósforo en el suelo (Fig. 2). Se calculó que la presión ambiental del sistema alimentario se incrementará alrededor de 51 a 92 % para cada indicador si no se implementan cambios tecnológicos en los sistemas productivos u otras medidas de mitigación. El mayor incremento de estos impactos ambientales se proyecta para las emisiones de GHG (+ 92 %) seguido por la demanda de uso de suelo para cultivos (+ 68 %), uso de recursos hídricos (+ 65 %) y la fijación de nitrógeno y fósforo en suelo (+ 51 %) (Springmann et al., 2018).

Adicionalmente un meta-análisis de 570 estudios de 139 autores distintos, estimó el impacto ambiental de 40 productos que representan 90% del consumo global de proteínas y calorías. Estos datos se obtuvieron de aproximadamente 38 700 productores en 119 países, se observó que grupos específicos de alimentos varían en su impacto ambiental (Fig. 3), en particular, la producción de productos de origen animal generan la mayoría de emisiones GHG (carne de ovino y de cordero) esto se debe a la baja eficiencia de conversión de alimento y la fermentación entérica proveniente de la microbiota en rumiantes que genera emisiones de metano equivalentes aproximadamente a 28 veces el potencial de efecto invernadero del dióxido de carbono, (Poore & Nemecek, 2018).

Con base en los datos anteriores es evidente que el sistema alimentario actual contribuye de manera significativa en la afectación de distintos aspectos ambientales tales como el cambio climático, cambio en uso de suelo, agotamiento de recursos hídricos así como la contaminación de ecosistemas acuáticos y terrestres a través de la fijación excesiva de nitrógeno y fósforo en suelo, por lo tanto se requieren acciones inmediatas para mitigar dichos problemas. Estas acciones incluyen cambios en los hábitos alimentarios, dietas basadas en proteína derivadas de plantas, mejoras en la tecnología productiva y administración, así como reducir las pérdidas de alimentos que se generan diariamente. De igual manera se han desarrollado una variedad de innovaciones basadas en herramientas de la biotecnología alimentaria como lo es la agricultura celular para obtener proteína alimenticia a partir de cultivos celulares (Lynch et al., 2018; Poore & Nemecek, 2018; Springmann et al., 2018).

Si bien el adoptar una única alternativa como solución a esta problemática no será suficiente para mitigar el impacto de la industria alimentaria, en particular el impacto ambiental de la industria cárnica, es posible que la combinación de estas medidas tendrá un efecto sinérgico en reducir los impactos ambientales en el futuro (Poore & Nemecek, 2018).

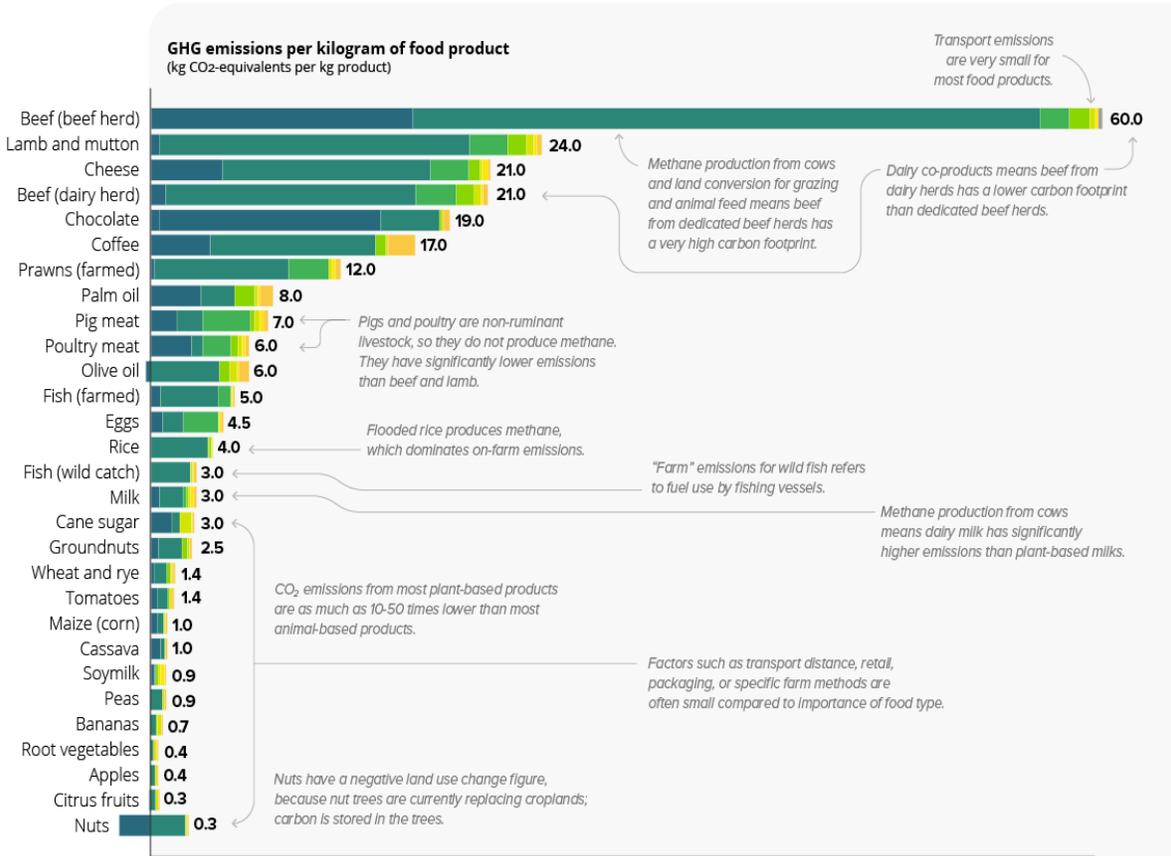
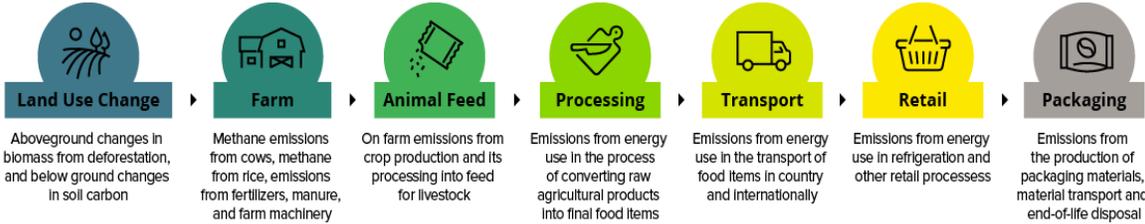


Figura 3. Contribución de emisiones de gases de efecto invernadero de distintas partes del proceso de producción para varios productos alimentarios. Figura tomada de Poore & Nemecek, 2018

Agricultura celular como alternativa de producción de proteína para consumo humano

El término agricultura celular se define como la utilización de cultivos celulares de una variedad de organismos huéspedes para la obtención de productos agrícolas, sustituyendo la producción a través de la crianza de animales o cultivos de plantas. Dependiendo del tipo de huésped que se utilice, pueden obtenerse distintos productos de interés comercial (Rischer et al., 2020).

Células de animales

La producción de células de mamíferos se ha enfocado en producir la denominada “carne limpia”, “carne cultivada en laboratorio” o carne *in vitro*, se trata de un producto alimentario complejo que comprende células animales de tejido muscular, grasa y tejido conectivo como mioblastos. Las células musculares o adiposas se producen en un medio de cultivo adecuado en un biorreactor y son capaces de producir esta carne que es nutricionalmente similar a la carne convencional, pero carece de estructura. Actualmente hay una gran tendencia en buscar alternativas para reemplazar la proteína animal con ingredientes derivados de la biotecnología y esta carne *in vitro* parece ser una buena opción. En el año 2013 la primera hamburguesa “libre de sacrificio animal” basada en carne cultivada fue hecha por la recién formada compañía Mosa Meat, con un costo estimado de 250 000 euros (Rischer et al., 2020). Se espera que mientras la tecnología continúe desarrollándose los costos de producción disminuyan, mientras tanto los retos de producir esta carne cultivada son el requerimiento de medios de cultivo adecuados (alternativos al suero fetal bovino) para el crecimiento, proliferación y diferenciación celular así como la escalabilidad del proceso (Gaydhane et al., 2018). Adicionalmente un aspecto importante a considerar desde el punto de vista nutricional es el aporte de hierro de la carne de origen animal que no aporta la carne *in vitro*. Algunas estrategias para compensar la deficiencia de este nutriente es el cultivo de las células bajo condiciones de baja oxigenación, adición de lípidos o ácido acético al medio los cuales estimulan la expresión de mioglobina o suplementación del medio con hierro (Fraeye et al., 2020).

Por otro lado, la empresa Finless Foods cultiva células de peces que son alimentadas con sales, azúcares y proteínas en bioreactores. Este producto entrará en venta en el mercado de Estados Unidos de América para el año 2022 (Waltz, 2021).

Células vegetales

La sustitución de proteína animal por alternativas basadas en plantas fue una de las primeras propuestas para solucionar la problemática de la carne, por ejemplo, el consumo de soya y legumbres, sin embargo, estos productos contienen pequeñas cantidades de aminoácidos esenciales comparados a derivados de proteínas animales (Rischer et al., 2020). Además, la digestibilidad de proteína vegetal es menor que la proteína animal, esto se refiere a la proporción de aminoácidos ingeridos disponibles para el organismo después de los procesos de digestión y

absorción intestinal de la proteína (Tomé, 2013). La digestibilidad reducida está asociada a factores anti-nutricionales los cuales son compuestos que tienden a reducir la disponibilidad de nutrientes de los alimentos. Algunos ejemplos de factores anti-nutricionales presentes en alimentos con proteína de origen vegetal son: inhibidores de proteasas; saponinas las cuales reducen la integridad de las células intestinales epiteliales y también afectan la absorción de vitamina A; y ácido fítico, este último forma complejos con iones metálicos e inhiben su absorción (Samtiya et al., 2020).

Sin embargo, el cultivo de células vegetales se ha enfocado hacia la producción de metabolitos secundarios, principalmente farmacéuticos y cosméticos, y solo recientemente se ha sugerido a las células vegetales, en sí mismas, como alimento. La ventaja que ofrece esta alternativa es que los medios de cultivo para este tipo de células son químicamente definidos y consisten en su mayoría de ingredientes inorgánicos como sales y azúcares simples como sacarosa (Rischer et al., 2020).

Células bacterianas

Single Cell Protein (SCP)

Por otro lado, se ha propuesto el uso de células microbianas para la obtención de proteínas utilizando la misma biomasa celular la cual es referida como “single cell protein”. La SCP puede contener de 50 a 80% de proteína en base seca y su composición de aminoácidos esenciales es comparable o mayor a las recomendaciones de la FAO. Por otra parte la SCP bacteriana tiene alto contenido de ácidos nucleicos (8 a 12%), especialmente RNA, por lo que requiere procesamiento previo a su utilización para consumo (Rischer et al., 2020; Ritala et al., 2017). Esta estrategia de producción de proteína ya ha sido implementada para alimentación animal. La SCP bajo el nombre comercial “Pruteen” se produjo mediante la bacteria *Methylophilus methylotrophus* a partir de metanol. Pruteen contenía más de 70% de proteína y se usó para la alimentación de ganado porcino. Sin embargo Pruteen no pudo competir con otros alimentos más baratos disponibles en la época (década de 1970) y su producción fue descontinuada. Recientemente la utilización de metano en vez metanol como fuente de carbono para producir SCP ha ganado interés. La compañía danesa UniBio ha desarrollado tecnología en fermentación para convertir metano generado como sub-producto de la crianza de ganado ovino y porcino en alimento para animales utilizando bacterias metanotrofas. La SCP obtenida denominada Uniprotein® consiste aproximadamente de un 72% de proteína y es utilizada para alimentación animal. Inicialmente las SCP ganaron importancia en la nutrición humana durante las épocas de guerra a mediados del siglo XX cuando algunas fuentes de proteína escasearon. Por ejemplo, la proteína derivada de microhongos que actualmente ya es comercializada como “Quorn” obtenida de *Fusarium venenatum* y “Pekilo” obtenida de *Paecilomyces varioti* (Alcorta et al., 2021).

Actualmente se ha recobrado el interés en estos alimentos ante la creciente demanda de proteína alimenticia, y algunos países con una gran población como China e India han comenzado a realizar investigación y desarrollo de nuevas tecnologías para producir SCP (Ritala et al., 2017).

Proteínas sintéticas

La células bacterianas se han empleado también para la producción de proteínas sintéticas las cuales son moléculas diseñadas mediante ingeniería genética que imitan o mejoran la función de las proteínas nativas y son “cosechadas” directamente de cultivos celulares (Global Alliance for Human Nutrition, 2018). La producción de proteínas alimenticias por organismos genéticamente modificados puede representar una solución para atender las demandas de proteínas de calidad de la creciente población, ofreciendo procesos sustentables con la ventaja de que estos OGM producen compuestos específicos en elevadas cantidades. Este enfoque ha revolucionado ya la industria biotecnológica y farmacéutica sin embargo la producción de proteínas para consumo humano no ha seguido esta tendencia debido a la competencia con fuentes tradicionales de proteína y una controversia acerca de uso de OGM (Vestergaard et al., 2016).

Sin embargo, en la actualidad existen compañías que producen proteínas alimenticias para consumo humano derivadas de cultivos celulares y que se comercializan en el mercado. La empresa Clara Foods produce por vía fermentativa albumina de huevo mediante levaduras genéticamente modificadas y azúcares como fuente de carbono, esta proteína puede utilizarse como suplemento, producto para hornear, ingrediente en bebidas o como un remplazo para la proteína de clara de huevo (Anchel, 2016).

Por otra parte, la compañía Perfect Day Foods comercializa productos lácteos “libres de vacas” produciendo proteínas por vía fermentativa. Con el objetivo de ofrecer un sustituto a la leche que replique el sabor, la composición de la leche natural y que además pueda ser utilizado en procesos subsecuentes para producir distintos productos lácteos, recientemente desarrollaron una formulación a base de lactoglobulina recombinante producida por la levadura *Trichoderma reesei*, que imita las características organolépticas de la leche natural y resultan en un producto que tiene un aporte nutricional similar (Fig. 4), dicho producto ya ha sido aprobado por la FDA como seguro para el consumo humano (Pandya et al., 2017).

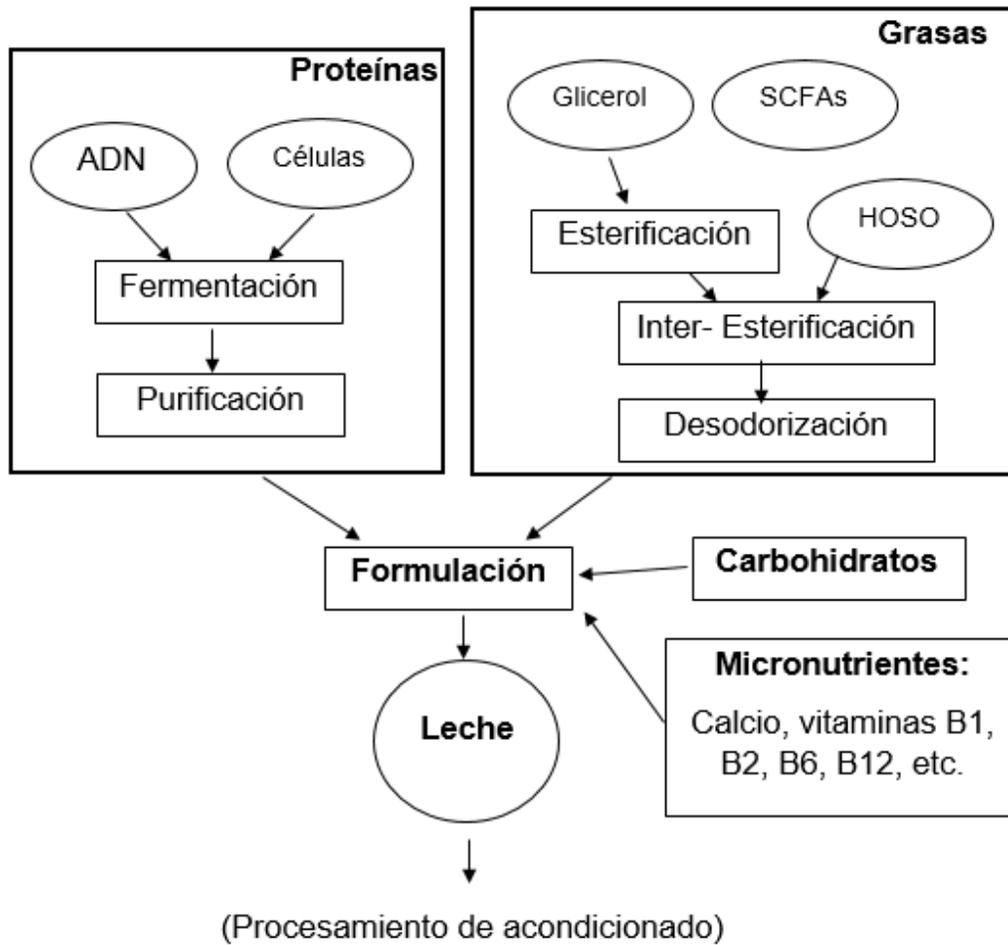


Figura 4. Diagrama de la producción de leche a base de lacto-globulina recombinante. La proteína obtenida por vía fermentativa es formulada junto con grasas, carbohidratos y micronutrientes que aportan las características nutricionales y organolépticas de la leche natural. SCFAs: Ácidos grasos de cadena corta; HOSO: ácido oleico de girasol. Figura adaptada de Pandya et al., 2017.

Expresión de proteínas recombinantes en *Pichia Pastoris*

La producción de proteína recombinantes emergió en la década de 1980 con el propósito de superar las dificultades que conllevan obtener las proteínas de interés de sus fuentes naturales (Baeshen et al., 2014). Las proteínas recombinantes se utilizan en distintas industrias como lo son la alimentaria, química y cosmética sin embargo encuentran su mayor aplicación en la industria bio-farmacéutica. La expresión de estas proteínas se ha realizado en una variedad de hospederos como bacterias, levaduras, células vegetales y células de mamíferos. En particular la bacteria *Escherichia coli* se ha utilizado preferencialmente debido a su rápido crecimiento y técnicas de cultivo simples (Jia & Jeon, 2020), sin embargo dependiendo de las características de la proteína de interés, el uso de esta bacteria no es posible, como es el caso en proteínas recombinantes que son glicosiladas o químicamente modificadas después de su traducción. Como alternativa a las bacterias se utilizan sistemas eucarióticos como levaduras, que tienen baja demanda de nutrientes en comparación a las células de mamífero y su crecimiento es más rápido, por lo que las levaduras han sido utilizadas para la producción de varias proteínas modificadas de manera pos traduccional (Nielsen, 2013). En años recientes la levadura *Pichia pastoris* ha sido utilizada para producir agentes terapéuticos comerciales como insulina humana, la vacuna para hepatitis B, Interferón Alfa 2B entre otros (Nielsen, 2013; Vieira Gomes et al., 2018).

Una característica importante de *P. pastoris* en la tecnología de alimentos es su estatus GRAS (generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés) reconocido por la FDA, por lo que en las últimas décadas este sistema de expresión se ha utilizado para la expresión heteróloga de enzimas para la industria alimentaria (Yang et al., 2018).

El proceso típico implementado industrialmente para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* es el cultivo en lote alimentado (CLA) y usualmente está dividido en 3 fases: fase en lote con glicerol, lote alimentado con glicerol e inducción con metanol. El objetivo de la primera fase es obtener altas concentraciones de biomasa y es denominada como la fase de crecimiento, alcanzando altas concentraciones de biomasa, después se requiere una fase con una alimentación de glicerol y posteriormente en la fase de inducción, se añade metanol de acuerdo a diferentes estrategias basadas, por ejemplo, en el consumo de metanol usando un sensor de metanol o basadas en el consumo de oxígeno. Debido a que el metanol funciona como inductor del promotor de la alcohol oxidasa I (AOXI) y como fuente de carbono, este afecta directamente el crecimiento celular y la expresión de proteína. Recientemente se han realizado distintos estudios con el objetivo de incrementar la producción de proteína heteróloga en esta levadura, enfocados en técnicas de diseño de vectores, promotores alternativos, monitoreo de fuente de carbono, optimización del proceso y cinética de crecimiento del producto, sin embargo siguen existiendo dificultades en obtener altos rendimientos en los procesos de CLA (Liu et al., 2019)

ANTECEDENTES

En estudios previos realizados por Mendoza-Cabrera y colaboradores en 2020 en el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular, se buscaron proteínas reportadas en las bases de datos (PDB, SwissProt y TreMBL) que cumplieran con la proporción recomendada de ingesta diaria recomendada de los 9 EAA. Utilizando códigos desarrollados en el lenguaje de programación Java, se restringió la búsqueda a proteínas con una composición máxima de 260 AA y que cubrieran la RDA en proporción igual a 1 (1X), se encontraron proteínas que cubrían hasta 4 EAA. Ampliando la búsqueda a una proporción de 2 a 4 veces el valor de la RDA, se obtuvieron proteínas que cubrían hasta 8 EAA. Adicionalmente se buscaron proteínas que complementaran en EAA a las proteínas de fuentes naturales (carne de res, cerdo, pollo, leche huevo y pescado), encontrándose proteínas que satisfacían mayor número de EAA mientras la RDA aumentaba. Las proteínas que complementaban en proporción 3 a 4 veces el contenido de EAA del huevo y leche fueron los mejores resultados cubriendo hasta 5 y 7 EAA.

Tras un análisis exhaustivo de la calidad nutricional de proteínas, se eligió la proteína Cadena alfa-1 de colágeno tipo XII (Collagen alpha-1(XII) chain, por su denominación en inglés) de *Bos taurus*, que esta codificada en el gen COL12A1 (Uniprot ID: P25508) y denominada en este trabajo como PCT12. Se planteó expresar la PCT12 de manera heteróloga en la levadura *Pichia pastoris* dado que es la proteína más cercana al contenido de EAA requiriendo pocas sustituciones de AA. Esta proteína se compone de 86 residuos AA y tiene un peso molecular de 8 kDa, su secuencia nativa de AA es la siguiente:

```
      10              20              30              40              50
NQP GPPGPPG   PPGSAGEPGP   GGRPGFPGTP   GMQGPQGERG   LPGEXGERGL
      60              70              80
PGPPGPQGES   RTGPPGSTGS   RGPPGPPGRP   GDSGIR
```

A partir de esta secuencia se mostró la posibilidad de obtener otras secuencias que contengan la proporción de EAA adecuada para la nutrición humana. Esto hace que la PCT12 sea una proteína molde útil para el diseño de proteínas optimizadas en su composición de EAA. Posteriormente se diseñaron variantes de la proteína de colágeno al mutar los residuos de AA de 20 en 20, con la excepción de los aminoácidos prolina y glicina. Estas variantes de la proteína de colágeno incorporan las sustituciones de AA para satisfacer el RDA de EAA en una proporción 2 a 4 veces mayor (Mendoza-Cabrera, 2020).

Proteína	Uniprot ID	Organismo		Longitud (AA)	Número de Sustituciones	Cambio total de la proteína (# de Sustituciones/Longitud)
Vasotocina - neurofisisina	P24787	<i>Gallus gallus</i>		161	27	16.77%
Proteína regulatoria RECX_PSEMY	A4XWQ3	<i>Pseudomonas mendocina</i>		150	25	16.66%
Proteína no caracterizada C16orf86 homólogo (Fragmento)	Q9GKT8	<i>Macaca fascicularis</i>		77	12	15.58%
Cadena alfa-1 (XII) de colágeno	P25508	<i>Bos taurus</i>		86	7	8.13%

Figura 5 . Resultados de la búsqueda en bases de datos SwissProt de proteínas que cumplen con los requerimientos de EAA recomendados. Se muestra el número de sustituciones de aminoácidos necesarias en la composición nativa de la proteína para cumplir con la RDA, además del porcentaje de cambio que estas sustituciones representan en la composición total de AA de la proteína. Figura tomada de Mendoza-Cabrera, 2020.

Producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* con promotores alternativos regulados por glucosa.

El promotor P_{GAP}

Se han identificado varios promotores constitutivos de *P. pastoris* para la producción de proteínas recombinantes (Çalık et al., 2015) sin embargo el más utilizado para la expresión de proteínas recombinantes a nivel industrial es el promotor constitutivo del gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (P_{GAP}). Este promotor es generalmente empleado para producir proteínas que no inhiban el crecimiento de *P. pastoris* (Cos et al., 2006). La principal ventaja de P_{GAP} es que el rendimiento de proteína recombinante es proporcional a la biomasa. Además evita problemas del uso de metanol (promotor AOX1) como son: limitación de oxígeno disuelto en el cultivo, una mayor generación de calor (Liu et al., 2016) y la acumulación de subproductos del metabolismo del metanol como formaldehído y peróxido de hidrógeno

(Çalik et al., 2015). En la figura 6 se comparan algunos ejemplos de proteínas recombinantes expresadas bajo el promotor GAP y con el promotor AOX1. De manera general las concentraciones de proteína heteróloga que se han obtenido con *P. pastoris* varían en concentraciones de varios gramos por litro y han sido producidas mediante cultivo en lote alimentado (Looser et al., 2015). Algunas de las concentraciones más altas de proteínas recombinante obtenidas con el P_{GAP} son el fragmento de anticuerpo recombinante (Fab) y la enzima lipasa con 2.1 g*L⁻¹ y 3.3 g*L⁻¹ respectivamente (Buchetics et al., 2011; Gurramkonda et al., 2010) siendo estas concentraciones comparables en orden de magnitud con proteínas producidas con el promotor AOX1 como la glucosa oxidasa con 19.6 g*L⁻¹ (Gu et al., 2015). Aunque estas concentraciones son parcialmente debidas a las altas concentraciones de biomasa y tiempos largos de cultivo (Çalik et al., 2015).

$C_{p, end}$ (g L ⁻¹)	Heterologous product	Time ^a (h)	CDW _{induction} ^b (g L ⁻¹)	CDW _{end} (g L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	Operation mode	Substrate	Promotor	Strain	References
Enzymes										
19.55	Glucose oxidase (<i>Aspergillus niger</i>)	168	100	245	NA	Feedback control (MeOH conc. at 1.8 v/v%)	Methanol/ mannitol	AOX	GS115	Gu et al. (2015)
5.8	Lipase/acetyltransferase (<i>Escherichia coli</i>)	119	20	74	0.01	Feed forward (exponential)	Methanol	AOX	GS115	Brunel et al. (2004)
3.3	Lipase (<i>Yarrowia lipolytica</i>)	77	-	120	NA	Feedback control (DO level between 25–35%)	Glucose	GAP	X-33	Wang et al. (2012)
-2.5	Cellobiohydrolase 2 (<i>Trichoderma reesei</i>)	90	-	NA	NA	Feed forward (linear)	Glucose	GAP	CBS7435	Mellitzer et al. (2012)
Antibody										
2.116	Fab fragment (human antibody 3H6)	-25	-	100	0.15–0.05	Feed forward (exponential and linear)	Glucose	GAP	X-33	Buchetics et al. (2011)
1.7	IgG1	182	-30 ^c	-138 ^c	0.014	Feed forward (exponential)	Methanol	AOX	YGLY4140	Potgieter et al. (2010)
0.198	scFv fragment (anti-bisphenol A)	-30	-60	-80	NA	Feedback control (MeOH conc. at 0.5 v/v %)	Methanol	AOX	GS115	Yamawaki et al. (2007)
0.046	Fab fragment (anti-HIV antibody 2F5)	92	-	96	0.2–0.05	Feed forward (exponential and linear)	Glucose	GAP	X-33	Maurer et al. (2006)
Hormone & growth factors										
3.84	Insulin precursor	-130	56	59	NA	Feedback control (MeOH conc. at 0.25 v/v %)	Methanol	AOX	X-33	Gurramkonda et al. (2010)
0.97	Insulin precursor (porcine)	80	59	-140	0.016	Feed forward (exponential)	Methanol	AOX	GS115	Hang et al. (2008)
0.76	GM-CSF (murine)	68	-25 ^c	-55 ^c	0.015	Feedback control (exponential)	Methanol	AOX	GlycoSwitch-Man5	Jacobs et al. (2010)
Interferone & interleukin										
0.25	rhlL-2-HSA fusion	60	-	250 (OD ₆₀₀)	NA	Feedback control (DO level between 25–40%)	Glucose	GAP	GS115	Guan et al. (2013)
0.392	Interferone (ovine)	70	NA	-117 ^c	0.025–0.020	Feed forward (exponential)	Methanol	AOX	X-33	Sinha et al. (2003)

NA not available.

-Values approximated from figures.

^a Time of product formation during fedbatch cultivation.

^b Not stated for constitutive GAP-controlled product formation.

^c Published parameter adapted from wet cell weight to dry cell weight by a factor of four.

Figura 6. Parámetros operacionales para procesos de alta productividad de distintas proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* bajo un sistema de cultivo en lote alimentado. Figura tomada de Looser et al., 2015.

El promotor P_{GTH1}

Por otra parte, en el año 2103 Prielhofer y colaboradores caracterizaron promotores inducibles como alternativa al promotor pAOX1 inducible por metanol o el promotor pGAP tomando en consideración las desventajas que estos conllevan para ser utilizados industrialmente. A través de micro arreglos de DNA se buscó identificar genes expresados a la alza en *Pichia pastoris* sometiénndola a condiciones limitantes

de la fuente de carbono, en este caso glucosa. Se identificaron 6 potenciales promotores, en particular, el promotor denominado PG1 correspondiente a un transportador de glucosa de alta afinidad (GTH1) mostró un cambio en su expresión relativa en condiciones de limitación de glucosa (Prielhofer et al., 2013) Siguiendo con la caracterización del promotor GTH1 y la optimización de estrategias para la producción de proteína se utilizaron variantes de este promotor bajo un régimen de cultivo alimentado, en este caso, se optimizó el perfil de alimentación de glucosa, de tal manera que se mantuvo una productividad elevada de la proteína durante la fase de alimentación, resultando en un proceso con productividad volumétrica de proteína de 58 mg/Lh superior comparada al utilizar el promotor pAOX1 de 21 mg/Lh , además de una reducción en el tiempo de cultivo de 124 a 63 horas lo cual sugiere que el promotor GTH1 puede ser implementado en bio-procesos industriales para alcanzar altos rendimientos de producto (Prielhofer et al., 2018).

Efecto de los parámetros de operación en la producción de proteína recombinante

Generalmente en los procesos de fermentativos los principales parámetros que influyen en la cantidad de proteína recombinante producida son: composición del medio, pH, temperatura y oxígeno disuelto (C_{DO}) que está asociado con la aeración y agitación (Çalık et al., 2015; Cos et al., 2006). A continuación, se revisan algunas estrategias utilizadas para evaluar el efecto de estas condiciones en la producción de proteína recombinante.

Medio de cultivo

Para la producción de proteínas recombinantes con P_{GAP} se utiliza principalmente glucosa y glicerol como fuente de carbono, generalmente el uso de glucosa resulta en mayores concentraciones de proteína recombinante (Pal et al., 2006). Se ha reportado una estrategia de fermentación en dos etapas usando glicerol como principal fuente de carbono en el cultivo en lote y glucosa en la fase de lote alimentado debido a la menor generación de calor y rendimiento en el consumo de oxígeno. La selección de la fuente de carbono puede depender entonces del modo de fermentación (lote o lote alimentado) y si la finalidad es obtener un alto rendimiento de proteína recombinante o producir alto rendimiento de proteína y altas concentraciones celulares (García-Ortega et al., 2013).

El uso de casaminoácidos (CA), que son los componentes principales de medios complejos, puede proteger a las proteínas recombinantes de la degradación proteolítica. Goodrick y colaboradores reportaron que la adición de 10 g L⁻¹ de casaminoácidos estabilizó el rendimiento para la producción de quitinasa humana recombinante (Goodrick et al., 2001). La suplementación del medio con CA ha sido asociada con la reducción en la actividad proteolítica en el medio de cultivo (Pal et al., 2006). Sin embargo, Kaushik y colaboradores sugieren que la concentración de la proteína recombinante EDIII incrementa por la secreción regulada por CA en un mecanismo aun no descrito (Fig. 7) y no debido a la actividad proteolítica (Kaushik et al., 2016).

Por otro lado, debe considerarse que el uso de CA no es sustentable económicamente en un proceso productivo a gran escala de proteína recombinante, ya que típicamente se usan medios de cultivo químicamente definidos en este tipo de procesos debido a la consistencia en su composición y bajos costos comparados a los medios de cultivo complejos (Matthews et al., 2018).

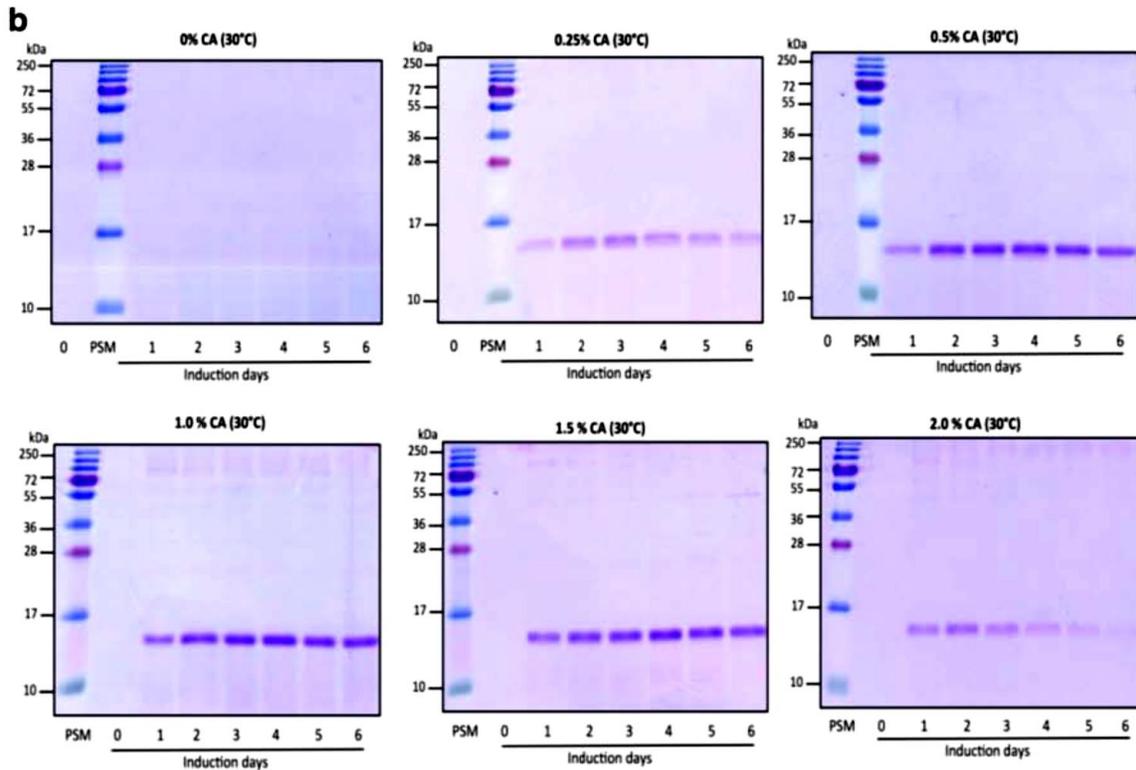


Figura 7. SDS-PAGE con tinción Coomassie mostrando la proteína heteróloga secretada EDIII (Dominio del serotipo 3 del virus del dengue) en medio de cultivo BMM con distintas concentraciones de casaminoácidos (%CA) (Kaushik et al., 2016).

Por otra parte Fei y colaboradores reportaron el uso de aminoácidos precursores, en este caso ácido glutámico, cisteína y glicina para la producción de glutatión (tripeptido Cys-Glu-Gly) resultando en un rendimiento 4.6 veces mayor (Fig. 8) (Fei et al., 2009). Sin embargo, se debe tomar en consideración el contenido de aminoácidos de la proteína recombinante objetivo para la optimización del medio pues los aminoácidos limitantes son específicos para cada caso. Generalmente la suplementación con aminoácidos “desahoga” el metabolismo para la producción de proteína recombinante debido a que la composición de aminoácidos de la proteína recombinante puede afectar la capacidad de producir dicha proteína (Heyland et al., 2011); especialmente proteínas que difieren significativamente de la composición promedio del proteoma de *P. pastoris* y requieren mayores flujos en rutas metabólicas fuertemente reguladas como aminoácidos aromáticos y ramificados (Heyland et al., 2011).

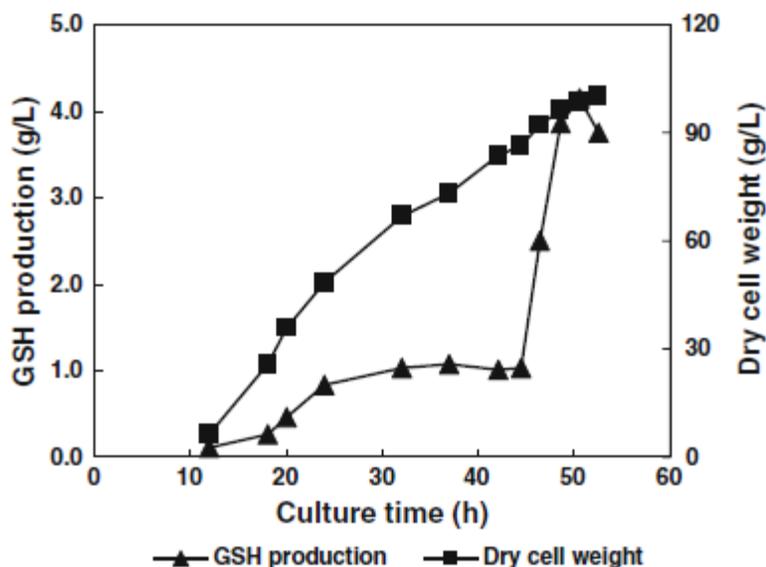


Figura 8. Cultivo en lote alimentado de *P. pastoris* con adición de aminoácidos precursores, 30 °C, pH 5.0. La mezcla de aminoácidos (ácido glutámico, cisteína y glicina) se añadió a las 44 h de cultivo (Fei et al., 2009)

Concentración de oxígeno disuelto (C_{Do}) o condiciones de transferencia de oxígeno.

En los procesos de fermentación de *P. pastoris*, generalmente la C_{Do} se mantiene alrededor de 20 a 30% de saturación de aire, operando el biorreactor con agitación constante y el aire es suministrado mediante un sistema de aireación para alcanzar condiciones aeróbicas (Çalik et al., 2015). Cuando se alcanzan altas densidades celulares, se suministra aire enriquecido de oxígeno pues los requerimientos de oxígeno son mayores. Se ha reportado que las condiciones aeróbicas permiten una mejor producción de proteína recombinante (Zhang et al., 2007) aunque también otros estudios sugieren que la condición de hipoxia mejora el rendimiento de proteína recombinante (Baumann et al., 2010). Por tanto, hay que considerar la saturación de aire alrededor 20 a 30% como rango recomendado de operación y también evaluar el potencial de producir la proteína recombinante en condiciones de hipoxia, permitiendo reducir la demanda de oxígeno lo cual es deseable en una fermentación a nivel industrial (Çalik et al., 2015).

pH del medio de cultivo

Los procesos de producción de proteína recombinante por *P. Pastoris* requieren condiciones de pH controladas, el intervalo de pH más comúnmente usado es de 5.0 a 6.0, aunque la levadura puede crecer en un intervalo más amplio de 3 a 7 (Çalik et al., 2015). En algunos casos el valor se ha fijado en 5.5 para reducir la actividad de proteasas en el medio (Cos et al., 2006). Sin embargo, se han expresado proteínas con valores óptimos de pH distintos a dicho valor como la metil-adenosil transferasa a pH= 6.0 (Hu et al., 2008), la lipasa LIP2 de *Y. lipolytica* a pH = 7.0 (Fig.9) (Wang et al., 2012).

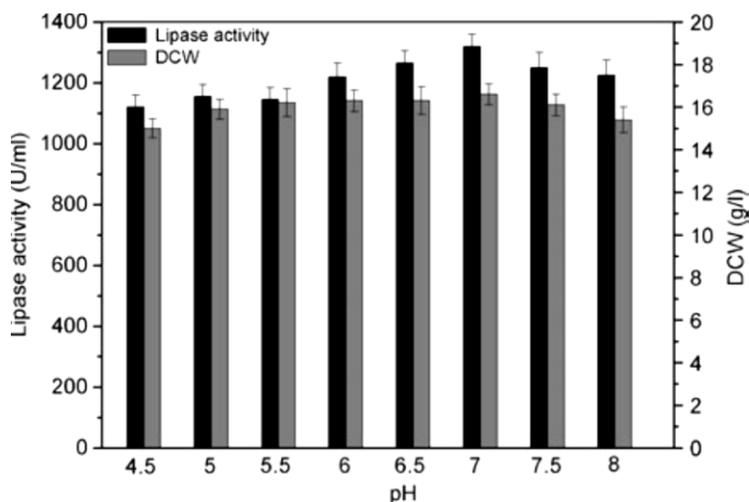


Figura 9. Efecto del pH en el crecimiento celular y producción de lipasa recombinante en *P. pastoris* con el promotor GAP (Wang et al., 2012)

Temperatura

El intervalo óptimo de temperatura de crecimiento y producción de *P. pastoris* es de 25 a 30 °C (Çalik et al., 2015), arriba de 32 °C la expresión de proteína y crecimiento decaen (Cos et al., 2006). Algunos autores señalan que cultivar la levadura a bajas temperaturas incrementa significativamente la producción de proteína heteróloga. Li y colaboradores disminuyeron la temperatura del cultivo de 30 °C a 23 °C y obtuvieron 3 veces más producción de una proteína anti-congelamiento (Li et al., 2001). Jahic y colaboradores mostraron que la disminución de la temperatura durante la fase de inducción a de 30 a 22 °C redujo la actividad proteolítica y la lisis celular incrementando la concentración de proteína recombinante 3.3 veces (Jahic et al., 2003). Adicionalmente Wang et al. evaluaron el efecto de la temperatura en la producción de lipasa recombinante (Fig. 10) incrementando la producción de la proteína a 28 °C (Wang et al., 2012).

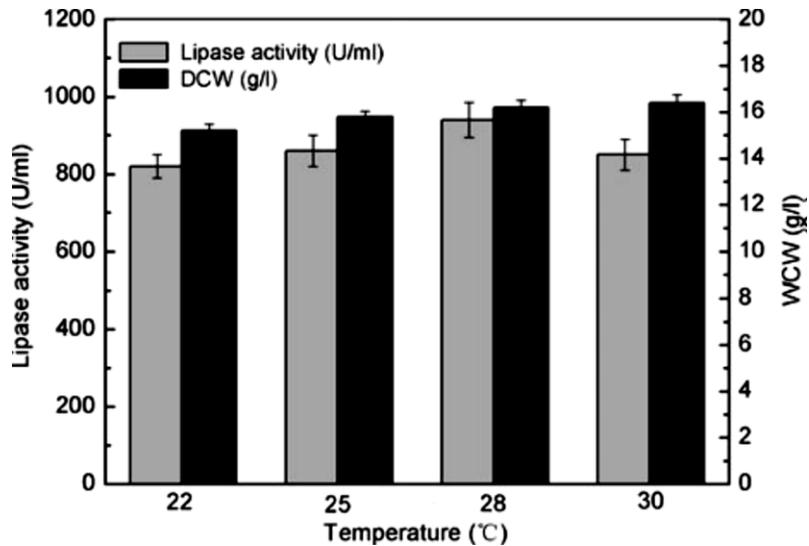


Figura 10. Efecto de la temperatura en el crecimiento celular de *P. pastoris* y la producción de Lipasa recombinante. Wang et al., 2012

Por otra parte, la disminución de la temperatura incrementa la solubilidad del oxígeno lo que aumenta la velocidad de transferencia de oxígeno pero disminuyen las tasas de reacciones intracelulares y de crecimiento (Cos et al., 2006).

Dragosits y colaboradores investigaron el impacto de la temperatura a T= 20, 25 y 30 °C, en el proteoma de *P. pastoris* la cual expresa la proteína Fab recombinante. Se observó que se afectaron al menos cinco procesos celulares: metabolismo energético, respuesta a estrés oxidativo, plegamiento de proteínas, metabolismo de aminoácidos y biogénesis de RNA ribosomal (Dragosits et al., 2009). Se reportó un incremento en la producción de Fab recombinante 3 veces mayor a 20 °C respecto al control cultivado a 30 °C observándose además un flujo metabólico reducido en el ciclo de ácidos tri-carboxílicos, niveles reducidos de proteínas de respuesta al estrés oxidativo y bajos niveles de chaperonas intracelulares. Esta información indica que el estrés de plegamiento se reduce a una baja temperatura, permitiendo una secreción más eficiente de proteína heteróloga. Lo anterior complementa la explicación del aumento de la productividad a temperaturas inferiores que se atribuía a una baja actividad proteolítica y mayor viabilidad celular (Dragosits et al., 2009).

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente existe una problemática en los métodos de producción de la industria alimentaria ya que la proteína de origen animal que se produce para consumo humano tiene un impacto significativo en distintos aspectos ambientales, principalmente la emisión de gases de efecto invernadero, eutrofización de suelo y alto demanda de recursos hídricos. Con el objetivo de mitigar estos impactos se ha planteado, entre otras medidas, sustituir gradualmente estos productos de origen animal, con productos cuyos procesos productivos sean más sustentables. En este sentido la biotecnología alimentaria moderna ofrece una solución a través de la expresión de proteína recombinante para consumo humano y actualmente existen compañías que desarrollan productos con proteína obtenida de microorganismos que poseen un aporte nutricional similar a los productos de origen animal.

Pensando en contribuir en el desarrollo de alternativas para la producción de proteína alimenticia por vía fermentativa, se propuso expresar en la levadura *P. pastoris* una proteína de composición muy cercana a la composición de aminoácidos esenciales óptima para la nutrición humana, que en trabajos previos del laboratorio se mostró es susceptible a ser diseñada en su composición de aminoácidos para adaptarla a diferentes necesidades de la dieta humana. A esa proteína nos referimos como proteína molde.

Actualmente para producir proteínas recombinantes en *P. pastoris* a nivel industrial se utiliza ampliamente el promotor AOX1 inducible por metanol, sin embargo, el uso de metanol a una escala industrial conlleva algunas desventajas como la eliminación de este en el producto final. Además, incrementa la generación de calor en el medio de cultivo.

Por lo anterior, el objetivo de este proyecto es evaluar la producción de esta proteína molde para posteriormente ser diseñada en su composición de aminoácidos y usarse en el consumo humano utilizando promotores regulados por glucosa como alternativa al promotor inducible de metanol. Se evaluarán también diversos parámetros del cultivo como temperatura, tipo de agitación y composición del medio con el objetivo de optimizar la producción de la proteína recombinante bajo dichos promotores. De esta manera podremos evaluar este sistema de expresión para su utilización en un proceso industrial sustentable.

HIPÓTESIS

El uso de un sistema de expresión con un promotor controlado por glucosa en *Pichia pastoris* permite obtener una alta producción de la proteína de colágeno tipo XII de *Bos taurus*.

OBJETIVOS

General

Analizar la producción de la proteína de colágeno tipo XII de *Bos taurus* en *Pichia pastoris* bajo promotores controlados por glucosa.

Específicos

1. Evaluar parámetros de operación como temperatura, oxigenación y composición del medio de cultivo de *Pichia pastoris* que incrementen la producción de proteína recombinante.
2. Analizar el nivel de expresión de la proteína recombinante intra y extracelularmente.
3. Cuantificar la proteína recombinante en el sobrenadante.
4. Establecer las condiciones óptimas para la producción de la proteína recombinante.

MÉTODOLÓGÍA EXPERIMENTAL

Expresión heteróloga de la proteína de colágeno tipo XII nativa de *Bos taurus* en *Pichia pastoris* con los promotores pGAP y pGTH1 en tubos de ensayo.

Se utilizó como control negativo la cepa de *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen) nativa (WT, por sus abreviación en inglés) en este y los experimentos posteriores. Para la expresión de PCT12 se utilizaron clonas de *Pichia pastoris* cepa X-33 transformadas con un plásmido que expresa la PCT12 nativa de *Bos taurus* bajo el promotor GAP o GTH1. Estas clonas se obtuvieron previamente en el laboratorio 205 del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular y están descritas en la Tesis de Maestría de Mendoza-Cabrera del año 2020. Para la construcción del plásmido bajo el promotor GAP el vector utilizado fue el vector pGAPZ α A (Fig. 11) el cual contiene el promotor GAP, el factor de secreción alfa de secreción extracelular y el epítipo myc, estos últimos dos están fusionados a la PCT12 para su secreción extracelular y posterior identificación. Para el diseño del plásmido bajo el promotor GTH1 se utilizó el esqueleto de pGAPZ α A y el promotor GAP fue sustituido por el promotor pGTH1.

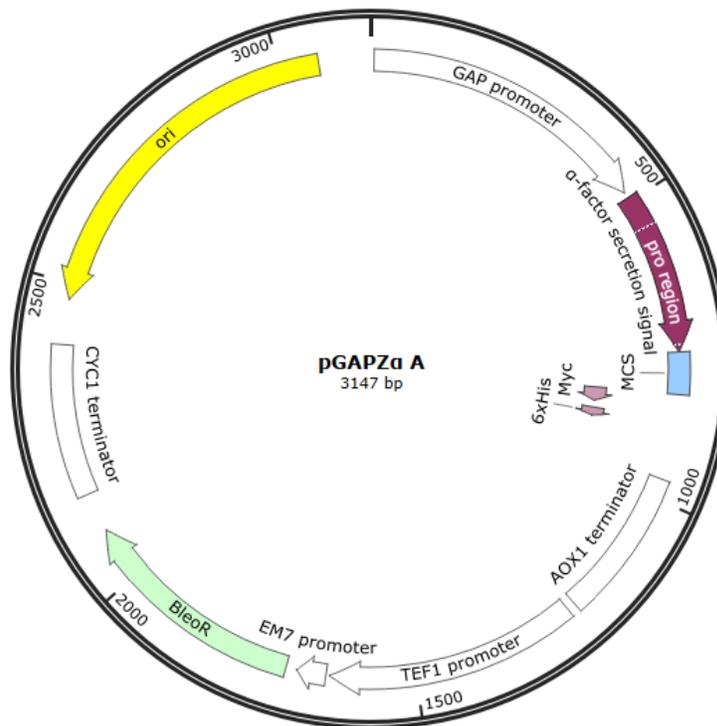


Figura 11. Vector pGAPZ α A utilizado para expresar la PCT12 bajo el promotor GAP; para la expresión de PCT12 bajo el promotor GTH1 se utilizó este mismo vector sustituyendo el promotor GAP con el promotor GTH1.

Las cepas se cultivaron en tubos con 5 mL de medio mínimo (SC) [composición: 20.0 g.L⁻¹ de glucosa, 6.7 g.L⁻¹ de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (YNB, por sus siglas en inglés), 1.0 g.L⁻¹ de fosfato de potasio monobásico, 790 mg.L⁻¹ de mezcla de aminoácidos] a una temperatura de 30° C y una velocidad de agitación de 240 rpm. Se midió la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm utilizando el espectrofotómetro UV-Vis GENESYS 10S (Thermo Fisher Scientific) y realizando una dilución 1:20 de la muestra (50 µL de muestra más 950 µL de medio SC). Las muestras se tomaron en los tiempos 24, 48, 72 y 96 horas.

Cultivo de la cepa de *Pichia pastoris* que contiene el vector que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP en matraces agitados.

La cepa transformada que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP se cultivó por triplicado en tubos de ensayo con 5 mL de medio mínimo (SC) a una temperatura de 30° C y una velocidad de agitación de 240 rpm por 24 horas tomando muestra cada hora, hasta que se alcanzó una densidad óptica de 5 unidades. Se transfirió 1 mL de cada inóculo a matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio mínimo SC con amortiguador de fosfatos (SC-B) [composición: 20.0 g.L⁻¹ de glucosa, 6.7 g.L⁻¹ de YNB sin aminoácidos, 1.0 g.L⁻¹ de fosfato de potasio monobásico, 790 mg.L⁻¹ de mezcla de aminoácidos y 100 mM de buffer de fosfato de potasio, pH 6.0]. Los matraces se incubaron a 30° C y 240 rpm, determinando biomasa y proteína soluble total.

Variación de las condiciones iniciales del cultivo para la evaluación de la producción de proteína soluble total.

Se modificaron algunas condiciones del cultivo como fuente de carbono inicial, biomasa inicial y temperatura para conocer su efecto en la producción de proteína soluble total.

Para evaluar el efecto de la fuente de carbono se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 50 mL de medio SC-B con distintas concentraciones de glucosa (20, 30 y 40 g.L⁻¹). Posteriormente se inocularon estos matraces con células de un pre-cultivo para obtener 0.1 unidades de densidad óptica inicial. Se cultivaron durante 12 horas a 30°C y 240 rpm.

Para cambiar la cantidad de biomasa inicial se cultivaron pre-inóculos en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio SC-B durante 24 horas a 30 ° C y 240 rpm alcanzando 5 unidades de densidad óptica. Posteriormente se centrifugaron 10

y 50 mL de este pre-inóculo a 14,000 rpm durante 3 minutos. Después se descartó el sobrenadante y se re-suspendió cada pellet de biomasa con 1 mL de medio SC-B para inocular matraces de 250 mL con 50 mL medio SC-B obteniendo densidades ópticas iniciales de 1 y 5 respectivamente. Se incubaron durante 12 horas a 30 °C y 240 rpm.

El efecto de la temperatura se evaluó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio SC-B. Se inocularon con células de un pre-cultivo para obtener 0.1 unidades de densidad óptica inicial y se cultivaron durante 12 horas a 25 °C y 240 rpm.

Cultivo de la cepa que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP en condiciones optimizadas para la producción de proteína soluble total.

La cepa transformada que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP se cultivó por triplicado en tubos de ensayo con 5 mL de medio mínimo SC 3% [composición: 30.0 g.L⁻¹ de glucosa, 6.7 g.L⁻¹ de YNB sin aminoácidos, 790 mg.L⁻¹ de mezcla de aminoácidos, 1.0 g.L⁻¹ de fosfato de potasio monobásico y 100 mM de buffer de fosfato de potasio pH 6.0] a una temperatura de 30° C y una velocidad de agitación de 240 rpm por 24 horas, hasta que se alcanzó una densidad óptica de 5 unidades. Se transfirió 1 mL de cada inóculo a matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio mínimo SC 3%. Los matraces se incubaron a 25° C y 240 rpm durante 24 horas, determinando biomasa y proteína soluble total cada hora de cultivo.

Evaluación del efecto de la oxigenación del cultivo en la secreción de PCT12

Con el objetivo de evaluar el efecto de una mayor oxigenación del medio de cultivo en la producción de PCT12, se disminuyó la relación de volumen del medio de cultivo respecto al volumen del matraz. Para esto se cultivó la cepa que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 25 mL de medio mínimo SC 3%.

Para evaluar condiciones de menor oxigenación del medio, se cultivó dicha cepa en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL ó 200 mL de medio mínimo SC 3% (condiciones de oxigenación moderada y oxigenación mínima, respectivamente), ambos experimentos se realizaron con 0.1 unidades de D.O. inicial, 25 °C y 240 rpm. Se tomaron muestras de los cultivo cada 24 horas hasta las 96 horas.

Cultivos con medio mínimo suplementado.

Para evaluar el efecto de los casaminoácidos (CA) en el medio de cultivo se utilizó medio mínimo SC 3% suplementado con 1% de casaminoácidos [composición: 30.0 g.L⁻¹ de glucosa, 6.7 g.L⁻¹ de YNB sin aminoácidos, 10.0 g.L⁻¹ de casaminoácidos, 1.0 g.L⁻¹ de fosfato de potasio monobásico y 100 mM de buffer de fosfato de potasio pH 6.0] se cultivaron con 50 mL de este medio en matraces Erlenmeyer de 250 mL, 0.1 unidades de D.O. inicial a 25 °C y 240 rpm. Se tomaron muestras del cultivo cada 24 horas hasta las 96 horas. Adicionalmente, para evaluar el efecto de una menor oxigenación con este medio suplementado, se cultivó la cepa productora de la PCT12 bajo el promotor GAP matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio mínimo SC 3% + 1% casaminoácidos, con 0.1 unidades de D.O. inicial a 25 °C y 240 rpm. Se tomaron muestras cada 24 horas hasta las 96 para la condición de normoxia y hasta las 144 horas para la condición de oxigenación moderada.

Cuantificación de proteína soluble total y de PCT12 en el sobrenadante.

Para la determinación de proteína total en el medio de cultivo, la muestra de cada tiempo de cultivo se centrifugó a 12 000 rpm por 3 minutos y con el sobrenadante obtenido se determinó la proteína total mediante el método de Bradford el cual se basó en el protocolo Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad) modificando los volúmenes de los reactivos: se usaron 50 µL de muestra y 50 µL de reactivo de Bradford y se dejó reaccionar la mezcla durante 20 minutos en placas Corning de 96 pozos transparentes de fondo plano (Merck). De manera similar se preparó una curva de calibración con reactivo estándar de albúmina de suero bovino (BSA) a concentraciones de 0, 1.25, 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/mL de BSA. Se midió la absorbancia de las muestras y estándares a 595 nm en el lector de placas Infinite 200PRO (Tecan). La concentración de PCT12 se estimó mediante densitometría utilizando el software ImageJ, Se analizaron los geles de electroforesis de muestras de sobrenadantes y se obtuvo el porcentaje relativo de la banda de la PCT12 respecto a todas las proteínas del sobrenadante detectadas en cada tiempo de muestreo. De esta manera, conociendo la cantidad de proteína soluble total mediante el método de Bradford y el porcentaje de la PCT12, se calculó la concentración de PCT12 en el sobrenadante.

Cuantificación de glucosa.

La concentración de glucosa en el medio se determinó usando el kit de ensayo colorimétrico/fluorométrico de glucosa (Sigma-Aldrich). La muestra se centrifugó a 12 000 rpm durante tres minutos y se realizó una dilución del sobrenadante de 1:200 (5 μ L muestra + 995 μ L agua) para muestras mayores a 20 g/L de glucosa o una dilución 1:100 (10 μ L muestra + 990 μ L agua) para muestras con concentración igual o menor a 20 g/L. Se utilizaron placas Corning de 96 pozos transparente de fondo plano (Merck) añadiendo en cada pozo 10 μ L de muestra diluida, 40 μ L de Buffer de ensayo de glucosa y 50 μ L de mezcla de reacción (46 μ L de buffer de ensayo de glucosa + 2 μ L de sonda de glucosa + 2 μ L de mezcla de enzimas). De manera similar se preparó una curva de calibración a partir de un estándar de glucosa en concentraciones de 10, 8, 6, 4, 2 y 0 nmoles por pozo. Se midió la absorbancia de las muestras y estándares a 570 nm en el lector de placas Infinite 200PRO (Tecan).

Electroforesis en gel desnaturalizante y tinción de plata

Para visualizar la producción de proteína PCT12 mediante SDS-PAGE para péptidos pequeños se utilizó un gel de poliacrilamida, compuesto de un gel de apilador al 30% [Composición: 1370 μ L H₂O, 20 μ L EDTA 0.2M, 333 μ L Acrilamida al 30%, 250 μ L Tris-HCl 1 M pH 6.8, 20 μ L de Persulfato amónico al 10% y 1 μ L de TEMED] y un gel de resolución al 48%% [Composición: 350 μ L H₂O, 640 μ L Glicerol 50%, 1000 μ L Acrilamida al 48%, 1000 μ L Tris-HCl 3 M pH 8.9 / 0.3% SDS, 10 μ L de Persulfato amónico al 10% y 1 μ L de TEMED]. Se cargó el sobrenadante de la muestra control y de las cepas transformadas correspondientes a las 72 horas de cultivo donde se estimó la mayor concentración de proteína soluble total. Las bandas de proteínas se compararon con el marcador de peso molecular SeeBlue (Novex). Posteriormente se realizó una tinción de plata al gel de poliacrilamida con el método descrito en la Tabla 3.

Tabla 3 Metodología para la tinción de plata de gel de poliacrilamida

Paso	Solución	Tiempo de tratamiento
1.Fijación	metanol 50% ácido acético 12% 0.5 mL de formaldehído al 37%	1 h / 30 min
2.Lavado	Agua	2 min
3.Lavado	metanol 50%	3x20 min / 3x10 min
4.Lavado	Agua	2 min
5.Oxidación	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O 0.2 g/L	1 min
6.Lavado	agua	3x20 seg
7.Impregnado	AgNO ₃ 2 g/L 0.75 mL de formaldehído al 37%	15 min
8.Lavado	agua	2x20 seg
9.Revelado	NaCO ₃ 60 g/L Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O 4 mg/L 0.5 mL de formaldehído al 37%	-
10.Lavado	agua	2x1 min
11.Paro	metanol 50% ácido acético 12% 0.5 mL de formaldehído al 37%	-
12.Lavado	agua	-

Extracción de proteína intracelular

Se centrifugó 1 mL de muestra con aproximadamente 10⁸ células a 13 500 rpm durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se re suspendió la biomasa en 200 µL de buffer de lisis (0.1 M NaOH, 0.05 M EDTA, 2% SDS, 2% mercaptoetanol). Posteriormente, la muestra se calentó a 85 °C durante 10 minutos. El lisado celular se llevó a un pH neutro adicionando 5 µL de ácido acético 4 M y se homogenizó en el vórtex durante 30 segundos. Después se calentó nuevamente a 90 °C durante 10 minutos. Se adicionaron 50 µL de buffer de carga (0.25 M Tris HCl pH 6.8, 50% glicerol, 0.05% azul de bromofenol) y se homogenizó. Finalmente, la muestra se centrifugó a 13 500 rpm durante 1 minuto para su análisis mediante SDS PAGE.

Precipitación de proteína total con TCA

Se añadieron 700 µL de TCA 30% en acetona a 4 ° C a 700 µL de sobrenadante, y se homogenizó esta mezcla durante 10 segundos en el vortex. Se dejó precipitar la muestra durante toda la noche a -20 ° C. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm, 4 ° C durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con acetona fría, se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm, 4 ° C y se descartó el

sobrenadante. Se realizaron 2 lavados adicionales con acetona fría y se secó el pellet con una corriente baja de aire. El pellet se re-suspendió en buffer de carga 2X (Tris-HCL pH 6.8 100 mM, Azul de bromofenol 0.2%, SDS 2% y glicerol 20%) y se analizó por SDS-PAGE.

Western blot.

La transferencia de proteínas se realizó utilizando una membrana PVDF 45 µm (Inmobilon_P Sigma) y buffer de transferencia (Tris HCl 25 mM, glicina 192 mM, 20% Metanol) a 100 V (0.4 Amperes) durante 90 minutos. Posteriormente se bloqueó la membrana con una solución de TBS 1X, leche descremada al 5 % y Tween 20 0.1% durante 30 minutos. Se lavó la membrana 3 veces con una solución TBS 1X y Tween 0.1% durante 5 minutos cada lavado.

La membrana se dejó incubando toda la noche a 4 °C en una solución TBS 1X, leche descremada al 5 % y anticuerpo monoclonal primario Anti c-Myc Mouse (Novex) a una dilución 1:3000. Después se lavó la membrana 3 veces con una solución TBS 1X y Tween 20 0.1% durante 5 minutos cada lavado y se incubó a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Goat anti-Mouse IgG HRP (Merck) a una dilución 1:5000 durante 90 minutos. Nuevamente se lavó la membrana 3 veces con una solución TBS 1X y Tween 20 0.1% y finalmente se reveló por quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Scientific, ID 34577).

RESULTADOS

Cultivo de cepas transformantes de *Pichia pastoris* con plásmidos que expresan la PCT12 bajo los promotores GAP o GTH1 en tubo de ensayo.

Se cultivaron cepas transformantes de *P. pastoris* además de una cepa control nativa (X-33). En la Figura 12 se muestra la cinética de crecimiento celular de las cepas transformadas con los plásmidos que expresan la PCT12 con cada uno de los dos promotores evaluados. Se observó mayor concentración celular en la cepa transformada con el plásmido que contiene promotor GAP así como con la cepa con el plásmido que contiene el promotor GTH1 (4.93 ± 0.54 g/L y 5.12 ± 0.36 g/L respectivamente) con respecto a la cepa control sin plásmido (4.30 ± 0.58 g/L) a las 96 horas de crecimiento. Posteriormente, se cuantificó la acumulación de proteína soluble total en el sobrenadante a lo largo de la cinética de crecimiento mediante el método de Bradford. Las concentraciones obtenidas se muestran en la Figura 12. La máxima concentración de proteína soluble total en el sobrenadante de cultivo de las cepas transformantes con los promotores GAP y GTH1 fue de 3.60 mg/L y 3.83 mg/L respectivamente a las 96 horas de cultivo, mientras que en la cepa control fue de 7.14 mg/L, esta última obtenida a las 72 horas de cultivo. A partir de estos datos, se determinó la producción específica de proteína soluble total con respecto a la biomasa (Tabla 4).

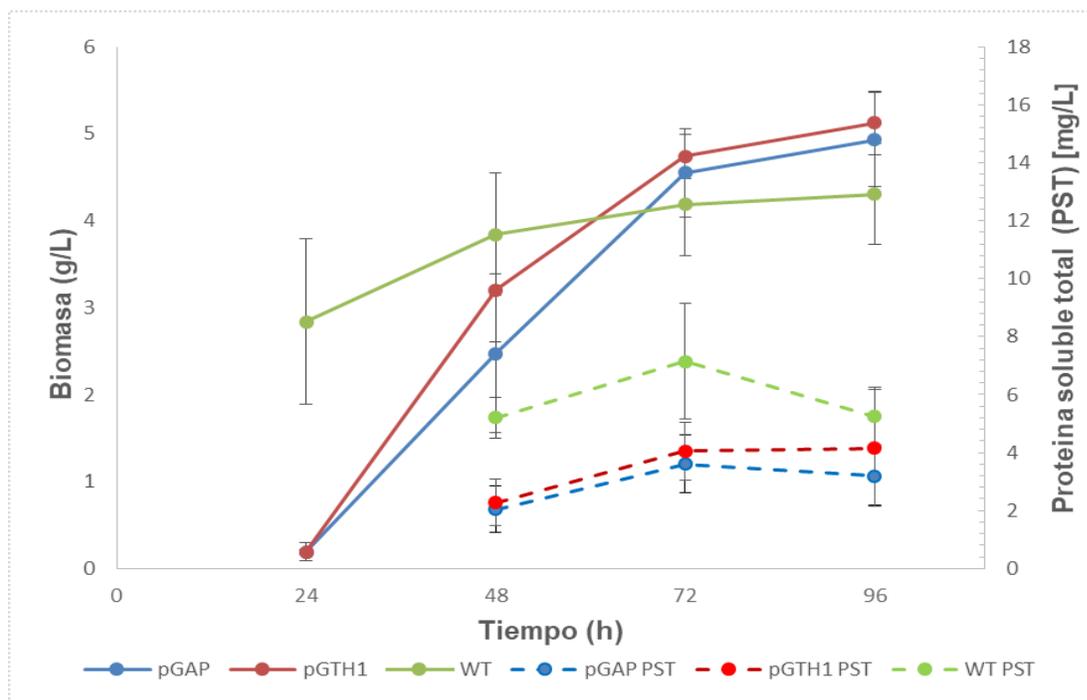


Figura 12. Cinética de crecimiento celular (líneas continuas) y concentración de proteína soluble total (PST) en el sobrenadante (líneas discontinuas) de cultivos de cepas transformadas de *Pichia pastoris* que expresan la PCT12 con el plásmido que contiene el promotor GAP (líneas azules) o el promotor GTH1 (líneas rojas). Cepa control nativa (líneas verdes).

Tabla 4 Comparación de rendimientos de las cepas con los promotores GTH1 y GAP cultivadas en tubos de ensayo

Parámetro	pGAP	pGTH1	WT
Biomasa (g/L)	4.93 ± 0.54	5.12 ± 0.36	4.3 ± 0.58
Proteína soluble total (mg/mL)	3.60 ± 2.63	3.83 ± 3.74	7.14 ± 3.61
Producción específica (mg proteína/ g células)	0.78 ± 0.54	0.74 ± 0.70	1.64 ± 0.66

*Medio de cultivo SC mínimo a 30 °C y 240 rpm

Electroforesis en gel y tinción en plata

A partir de los sobrenadantes de las muestras colectadas a las 72 horas de crecimiento, donde se alcanzó la mayor concentración de proteína total, se visualizó la producción de PCT12 mediante SDS-PAGE y tinción de plata (Fig.13)

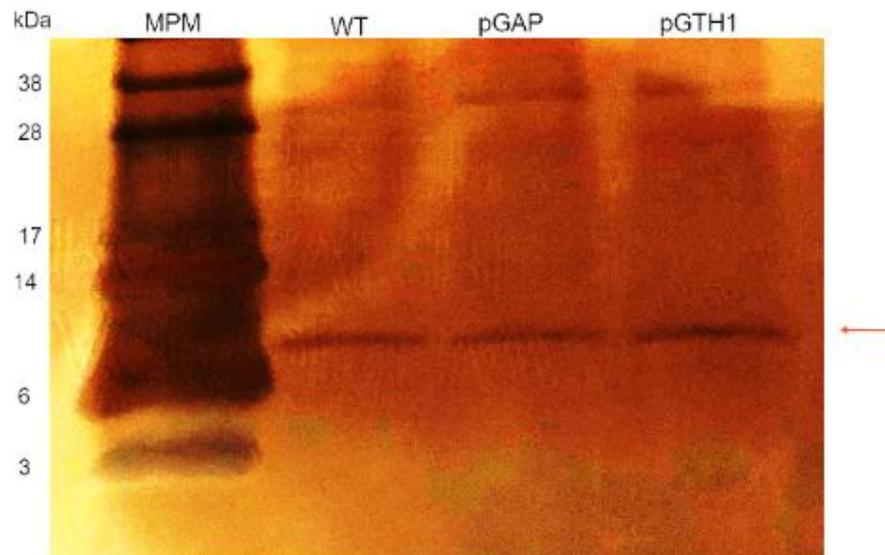


Figura 13. SDS-PAGE de muestras del sobrenadante a las 72 horas de cultivo. **Carril 1:** Marcador de peso molecular, **Carril 2:** Control, **Carril 3:** Cepa transformada con promotor GAP y Carril 4: Cepa transformada con promotor GTH1. La flecha roja señala una banda observada a un peso molecular aproximado de 8 kDa.

Se observó en el gel de la electroforesis una banda que corresponde a un peso molecular aproximado de 8 kDa (indicado con flecha) la cual coincide con el peso molecular teórico de la proteína de interés. Sin embargo, contrario a lo esperado, se obtuvo también una banda en la muestra control (WT) que coincide con el peso molecular de la PCT12. En experimentos posteriores, se verificó esta cepa control con cultivos en matraces agitados donde no se observó esta banda en el sobrenadante de cultivos de la cepa nativa (Ver página 50, Figura 17).

Efecto de las condiciones iniciales en la producción de proteína soluble total de la cepa transformante que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP.

En los experimentos en tubo de ensayo se observó que la PCT12 era el componente principal de proteína soluble en el sobrenadante por lo que se tomó esta consideración bajo la hipótesis de que un incremento en la concentración de proteína soluble total en el sobrenadante produce un incremento proporcional en la concentración de PCT12. Por lo anterior, se planteó aumentar la proteína soluble total en el sobrenadante variando las condiciones iniciales en cultivos en matraces agitados (Anexo 1) tomando como referencia las condiciones utilizadas en tubo de ensayo (fuente de carbono inicial = 20 g/L; temperatura = 30 °C).

Se evaluaron 3 distintas concentraciones de biomasa inicial y se observó una disminución en la producción específica de proteína soluble a medida que la biomasa inicial aumentaba (Anexo 2.1). La mayor producción específica se obtuvo con una densidad óptica inicial de 0.1 U.A. (Tabla 5). Por otra parte, la variación de la fuente de carbono no mostró tener un efecto significativo en la producción de proteína soluble, sin embargo, en el cultivo con una concentración inicial de fuente de carbono de 30 g/L se obtuvo un ligero incremento en la producción específica de proteína respecto a las otras concentraciones. Al comparar los cultivos a dos distintas temperaturas de incubación se obtuvo un incremento significativo en la producción específica de proteína soluble total a menor temperatura 25 ° C.

Tabla 5 Comparación de la producción específica de proteína soluble por la variación de parámetros de temperatura, fuente de carbono y biomasa inicial

Parámetro (unidades)	Valor	Producción específica (mg/g células)
Fuente de carbono inicial (g/L)	20	3.16 ± 0.26
	30	4.37 ± 0.89
	40	3.91 ± 0.88
Biomasa inicial (U.A. a 600 nm)	0.1	3.16 ± 0.26
	1	2.03 ± 0.05
	5	1.16 ± 0.04
Temperatura (° C)	30	3.16± 0.26
	25	15.4 ± 6.47

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 5 se identificaron las condiciones óptimas para la producción de proteína soluble total (30 g/L de fuente de carbono inicial, 0.1 D.O. inicial y 25 °C) y se realizó una cinética de crecimiento en estas condiciones para evaluar la producción de proteína soluble total en el sobrenadante (Fig. 14).

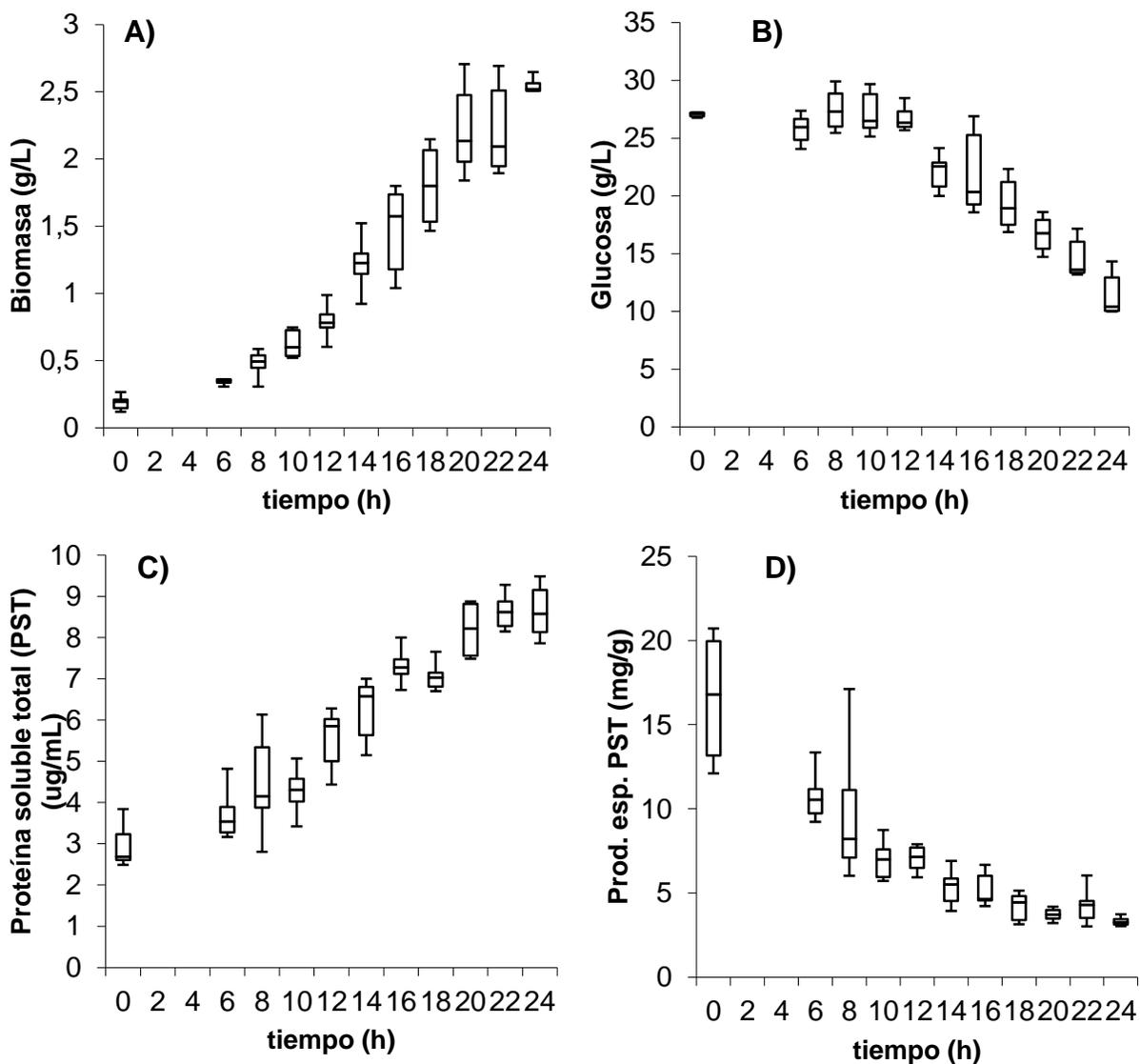


Figura 14. **A)** Cinética de crecimiento celular, **B)** consumo de fuente de carbono, **C)** concentración de proteína soluble total en sobrenadante y **D)** producción específica de proteína soluble total de cultivos de la cepa de *Pichia pastoris* que contiene el plásmido que expresa la proteína PCT12 bajo el promotor constitutivo GAP en matraces agitados. Condiciones: 25 °C, 240 rpm, fuente de carbono inicial =30 g/L, D.O. inicial= 0.1 U.A.

Comparando la producción específica de proteína total con las condiciones de los cultivos en tubo de ensayo, se obtuvo una mayor producción de proteína en las condiciones de 30 g/L de fuente de carbono inicial, 0.1 D.O. inicial y 25 °C (Tabla 6).

Sin embargo, no fue posible visualizar la proteína de interés en el SDS-PAGE del sobrenadante (Anexo 2.2), cabe mencionar que el cultivo con las condiciones optimizadas tuvo una duración de 24 horas a diferencia de los cultivos en tubos de ensayo que duraron 96 horas, además, la cinética de consumo de fuente de carbono muestra que la glucosa no se consumió completamente (Fig 18.B) lo cual mostró que el crecimiento celular aún no había alcanzado la fase estacionaria. Debido a esto se decidió extender el tiempo de cultivo para evaluar la secreción no asociada al crecimiento de la proteína de interés.

Adicionalmente se planteó la posibilidad de una inhibición del crecimiento celular debido a una oxigenación deficiente. Por lo anterior se disminuyó el volumen de medio de cultivo en los matraces con el objetivo de evaluar el efecto de la oxigenación en la producción de PCT12.

Tabla 6 Comparación de cultivos con cepas productoras de PCT12 con el promotor GAP en tubo de ensayo y matraz agitado

	Tubo de ensayo*	Matraz agitado (30° C)**	Matraz agitado (25° C)**
Biomasa (g/L)	4.93 ± 0.54	3.84 ± 0.08	2.61 ± 0.22
Concentración de proteína soluble total (mg/L)	3.60 ± 2.63	7.07 ± 0.80	8.60 ± 0.66
Producción específica proteína soluble total (mg/g)	0.78 ± 0.54	2.08 ± 0.31	3.31 ± 0.27

*Medio SC, t= 72h. **Medio SC con Buffer de fosfatos 100 mM pH 6.0, t=24h

Efecto de la oxigenación en cultivos de la cepa transformante de *Pichia pastoris* con el plásmido que expresa la proteína PCT12 bajo el promotor GAP en matraces agitados.

Cultivos con mayor oxigenación ($O_2 +$)

Se evaluó la secreción de la PCT12 en condiciones con mayor oxigenación y normoxia en cultivos en matraces agitados. Se detectó la proteína de interés en el sobrenadante en la condición de normoxia, donde se observó una banda de muy baja intensidad a partir de las 72 y 96 horas de cultivo, indicada con la flecha azul en la Figura 15.A. Por otro lado, se obtuvo mayor concentración de biomasa final en el cultivo con mayor oxigenación comparado con el cultivo en normoxia con una concentración de 9.75 ± 0.24 g/L y 7.18 ± 0.17 g/L respectivamente (Fig. 15.B y 15.C). Sin embargo no se detectó la PCT12 en condiciones de mayor oxigenación.

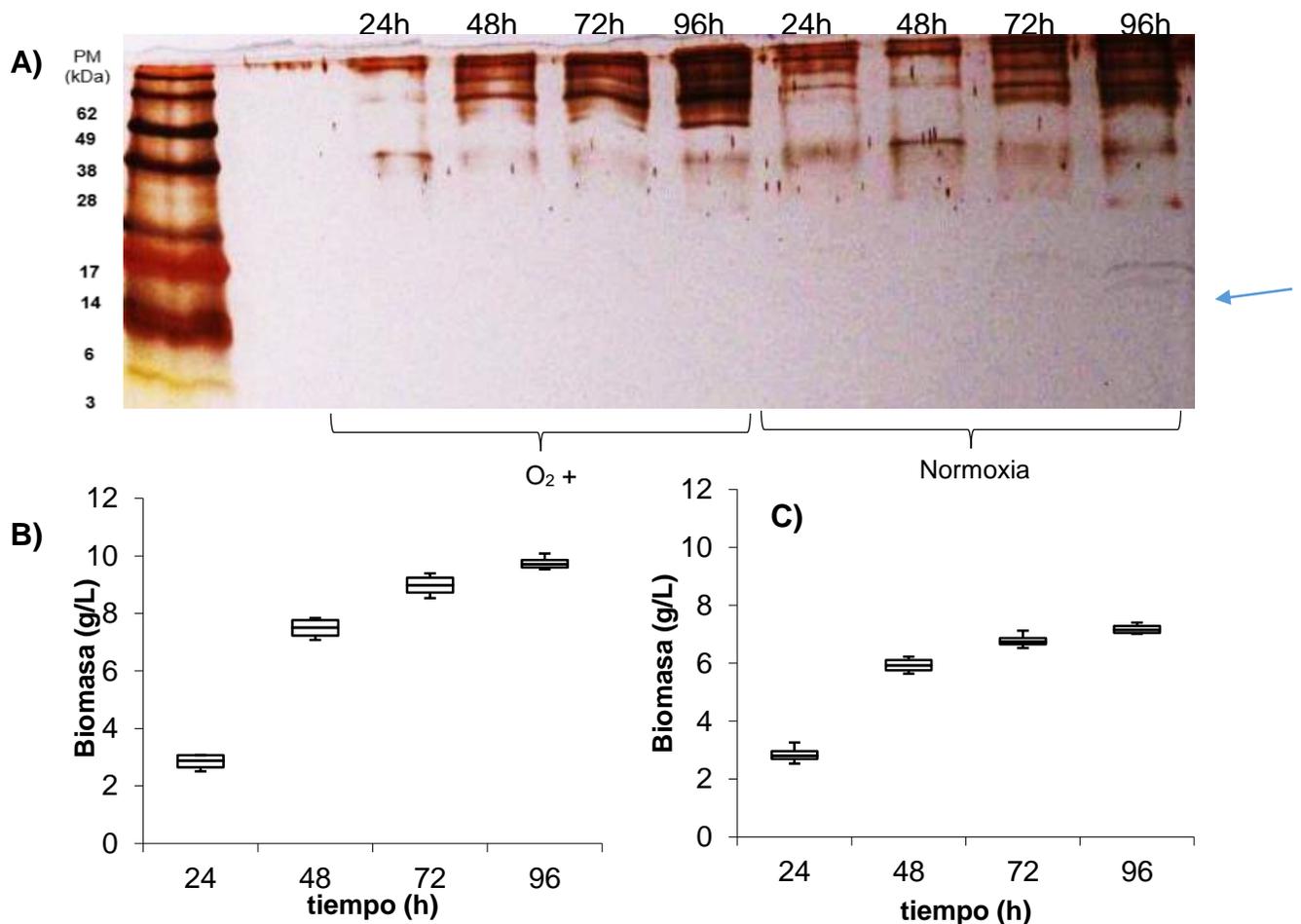


Figura 15. A) SDS-PAGE de sobrenadante de cultivos de *P. pastoris* transformada con el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP con mayor oxigenación ($O_2 +$). **Carril 1:** Marcador de peso molecular, **carril 2:** vacío; **carriles 3-6:** cultivo con mayor oxigenación; **carriles 7-10:** cultivo en normoxia. **B)** Cinética de crecimiento celular con mayor oxigenación **C)** cinética de crecimiento en normoxia. Condiciones de cultivo: medio mínimo SC 3%, 25 ° C y 240 rpm.

Cultivos en condiciones de menor oxigenación (O₂ -)

Se evaluaron dos condiciones de menor oxigenación con 100 mL y 200 mL de medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se detectó la proteína recombinante a partir de las 24 horas de cultivo en ambas condiciones (Fig. 16.A). La proteína se observó con mayor intensidad en la condición de oxigenación moderada (100 mL de medio). Por otro lado, no se detectó la proteína en ambos experimentos en el tiempo de 96 horas de cultivo. Se obtuvieron concentraciones de biomasa final de 6.99 ± 0.21 g/L y 5.70 ± 0.24 g/L respectivamente (Fig. 16.B y 16.C).

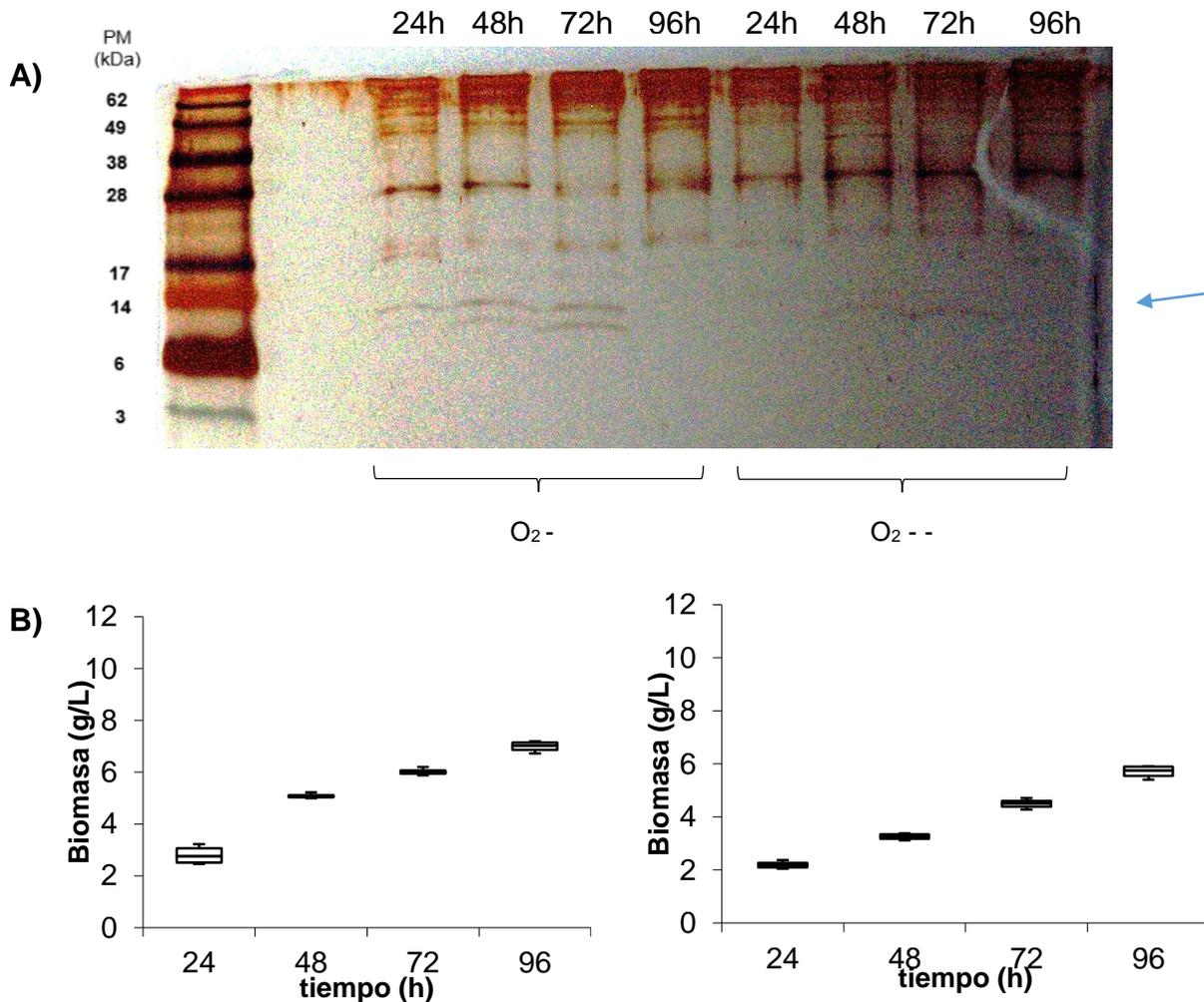


Figura 16. A) SDS-PAGE de sobrenadante de cultivos de *P. pastoris* que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP en oxigenación moderada (O₂-) y oxigenación mínima (O₂ - -); **Carril 1:** Marcador de peso molecular, **carril 2:** vacío; **carriles 3-6:** cultivos en oxigenación moderada **carriles 7-10:** cultivos en oxigenación mínima, **B)** cinética de crecimiento oxigenación moderada **C)** cinética de crecimiento en oxigenación mínima. Condiciones de cultivo: medio mínimo SC 3%, 25 ° C, 240 rpm.

Una vez que se identificaron las condiciones de cultivo en las cuales se observó la proteína de interés secretada en el sobrenadante con la cepa transformante, se cultivó la cepa nativa, en estas mismas condiciones las cuales fueron: cultivo en normoxia, en oxigenación moderada y medio suplementado con casaminoácidos. Lo anterior con la finalidad de verificar que la cepa control no secreta en el sobrenadante alguna proteína del mismo peso molecular de la PCT12. Esto se confirmó al no detectar ninguna banda de peso molecular alrededor de 8 kDa en el sobrenadante (Fig. 17).

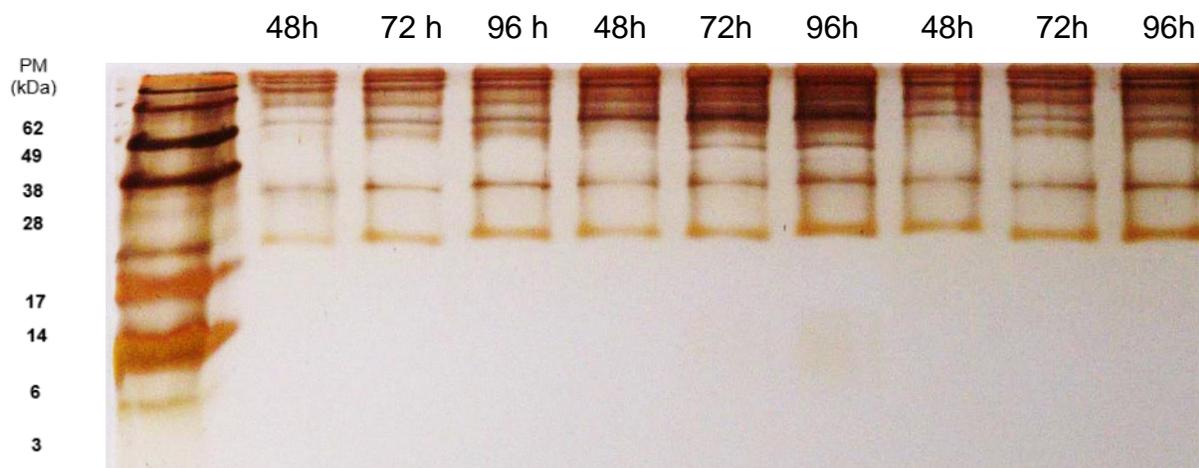


Figura 17. SDS-PAGE de sobrenadante de cultivos de *P. pastoris* cepa nativa. **Carril 1:** Marcador de peso molecular, **carriles 2-4:** cultivo en normoxia; **carriles 5-7:** cultivo en oxigenación moderada **carriles 8-10:** cultivo en normoxia + cas aminoácidos. Condiciones de cultivo: 25 ° C, 240 rpm. Medio mínimo SC 3%.

Western blot de proteína intracelular

En el análisis por inmuno-detección (Fig. 18.B) se detectaron varias bandas de distintos pesos moleculares en el lisado intracelular de la cepa transformada con el plásmido que expresa la PCT-12 bajo el promotor GAP. Para descartar que las señales observadas del lisado intracelular se debieran a una unión inespecífica del anticuerpo primario o secundario, se realizó un control con el lisado intracelular de la cepa control nativa y no se observó ninguna señal en estas muestras. Lo anterior sugirió que gran parte de la PCT12 se encuentra retenida intracelularmente y puede explicar su baja concentración en el sobrenadante. Adicionalmente en el western blot del sobrenadante no se detectaron señales de PCT12 por lo que se descartó la posibilidad de que la proteína se encuentre en forma de multímetro (Fig. 18.A).

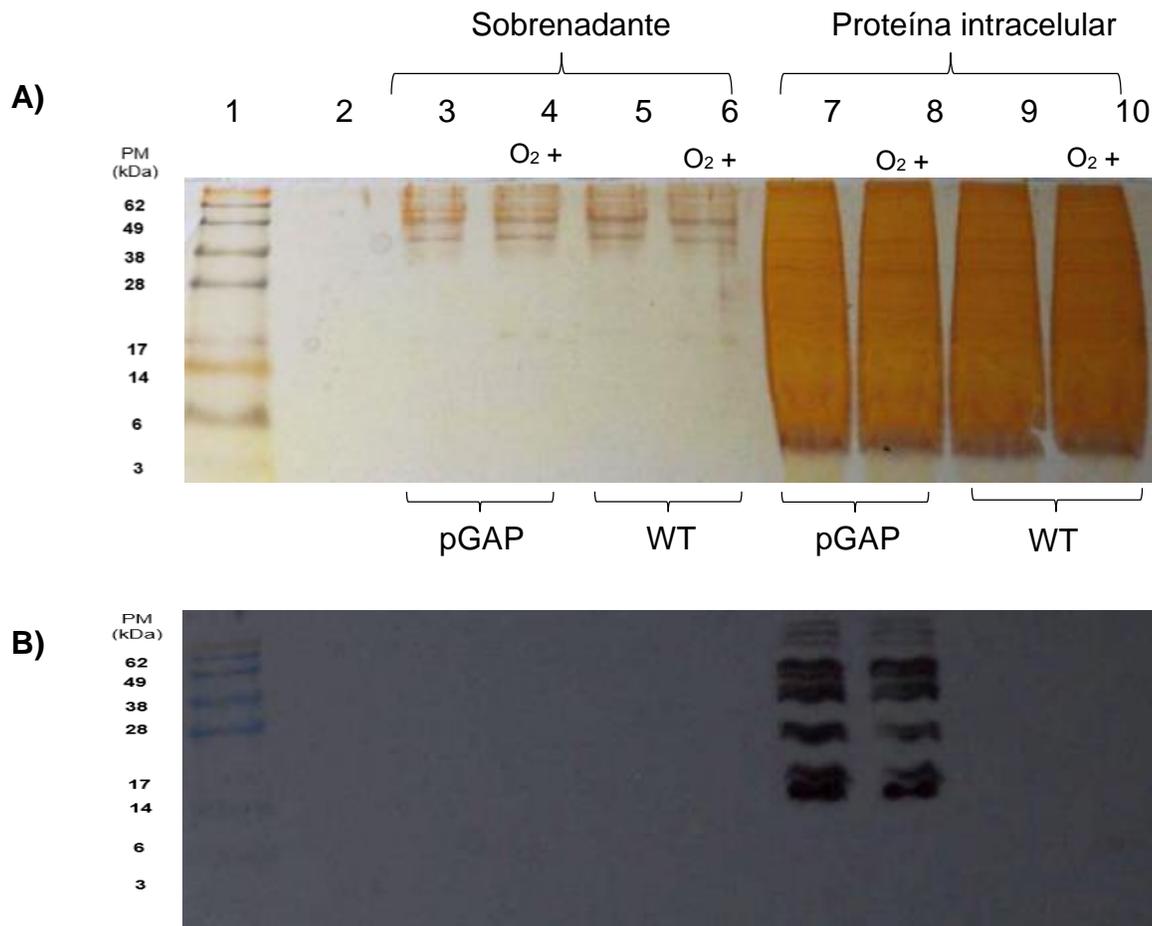


Figura 18. A) Análisis por SDS-PAGE y **B)** Western Blot de proteína soluble total en el sobrenadante y proteína intracelular de *P. pastoris* transformada con el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP (pGAP) a las 36 horas de cultivo.

Carril 1: Marcador de peso molecular; **carril 2:** vacío.

Carriles 3 y 7: Sobrenadante y proteína intracelular de *P. pastoris* con pGAP en normoxia

Carriles 4 y 8: Sobrenadante y proteína intracelular de *P. pastoris* con pGAP en mayor oxigenación (O₂ +).

Carriles 5 y 9: Sobrenadante y proteína intracelular de *P. pastoris* nativa en normoxia

Carriles 6 y 10: Sobrenadante y proteína intracelular de *P. pastoris* nativa con mayor oxigenación.

Condiciones de cultivo: Medio SC 3%, 240 rpm y 25 ° C.

Cultivos suplementados con casaminoácidos

La adición de casaminoácidos al medio de cultivo resultó en una mejora significativa en la cantidad de PCT12 detectada en el sobrenadante respecto a experimentos anteriores con medio mínimo sin casaminoácidos. Se detectó la proteína de interés a partir de las 24 horas de cultivo y con mayor intensidad a las 48 y 72 horas. Posteriormente a las 96 horas se observa en menor cantidad (Fig. 19.A). Por otra parte, se obtuvo una concentración de biomasa final de 11.52 ± 0.39 g/L (Fig. 19.C) que representa un rendimiento mayor respecto al medio mínimo probablemente por el uso de los aminoácidos como fuente de carbono. La proteína soluble total no varió de manera significativa a lo largo del tiempo de cultivo y alcanzó una concentración máxima de 24.24 ± 2.43 mg/L tras 96 horas de cultivo (Fig. 19.D). La concentración máxima de PCT12 en el sobrenadante fue de 2.91 ± 0.39 mg/L a las 72 horas de cultivo. Sin embargo, en términos de productividad específica de PCT12 se observó el máximo a las 48 horas de cultivo (Fig. 19.E). En el análisis de proteína intracelular por western blot se observó proteína retenida y de manera más intensa en las primeras 24 horas de cultivo (Fig. 19.B) a pesar de que en este tiempo la biomasa es menor. De manera interesante se observa a las 48 horas una señal más intensa entre los 14 y 6 kDa y probablemente corresponda a la PCT12 antes de ser secretada ya que se aprecia que esta señal abarca hasta un peso molecular aproximado a 8 kDa.

Cultivos suplementados con casaminoácidos en oxigenación moderada.

Se evaluó la condición de oxigenación moderada con casaminoácidos para analizar el efecto de la limitación de oxígeno la cual mejoró la concentración de proteína en el sobrenadante en el experimento con medio mínimo. En este cultivo el crecimiento celular se prolongó hasta los 6 días de cultivo alcanzando una concentración celular de 12.60 ± 0.18 g/L (Fig. 20.C) a diferencia del cultivo en normoxia, la proteína soluble total en el sobrenadante aumentó en los primeros tres días, se mantuvo sin variaciones significativas a partir del cuarto día y alcanzó un máximo de 34.63 ± 2.96 mg/L en el día 6 (Fig. 20.D). Si bien, se cuantificó mayor proteína en el sobrenadante, no mejoró la concentración de la PCT12 extracelular la cual alcanzó un máximo de 0.65 ± 0.04 mg/L en el día 4 de cultivo (Fig. 20.E) una posible explicación para esta baja concentración de PCT12 es la actividad proteolítica en el sobrenadante que se observa por el barrido o degradación de las proteínas del SDS-PAGE en varios pesos moleculares a partir del día 4 de cultivo (Fig. 20.A). Por lo anterior la máxima producción específica de proteína recombinante se alcanza en el día 2 de cultivo y fue de 0.10 ± 0.01 mg/L (Fig. 20.F). Al igual que en el cultivo en normoxia se observó un incremento en la señal que se encuentra entre los 6 y 14 kDa, sin embargo, en estas condiciones de menor oxigenación alcanzó mayor intensidad en el día 4 de cultivo (Fig. 20.B). Por otro lado, es notable una menor acumulación de la proteína intracelularmente en los tiempos iniciales del cultivo en comparación del cultivo con mayor oxigenación.

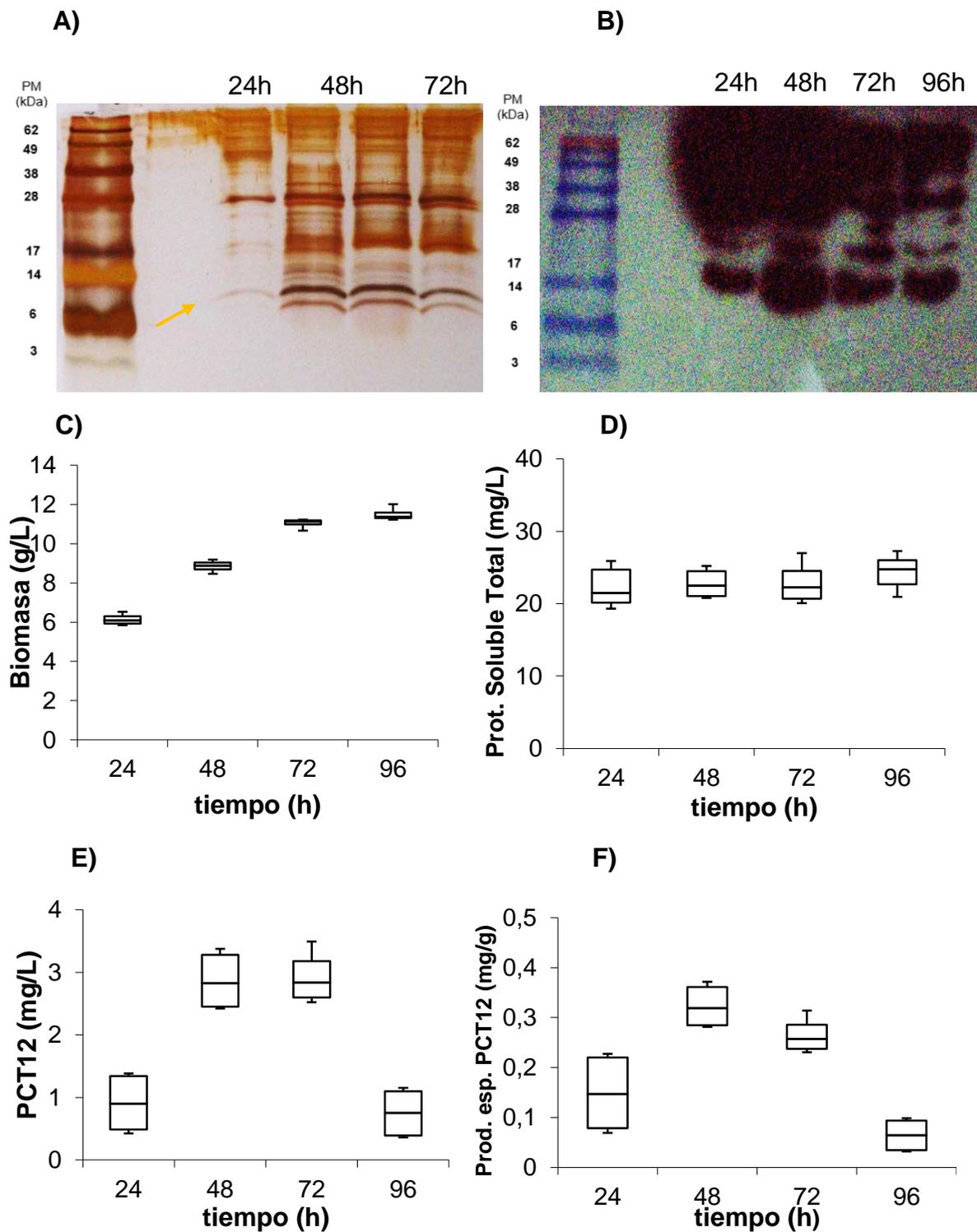


Figura 19. Cultivos en normoxia suplementados de *P. pastoris* que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP **A)** SDS-PAGE de sobrenadante; **carril 1:** Marcador de peso molecular, **carril 2:** vacío, **carriles 3 a 6:** muestras. **B)** Western blot de proteína intracelular. **C)** Cinética de crecimiento celular. **D)** Proteína soluble total en el sobrenadante. **E)** PCT12 en el sobrenadante. **F)** Producción específica de PCT12 por gramo de células. Condiciones de cultivo: medio mínimo SC 3% + 1% casaminoácidos, 25 ° C, 240 rpm.

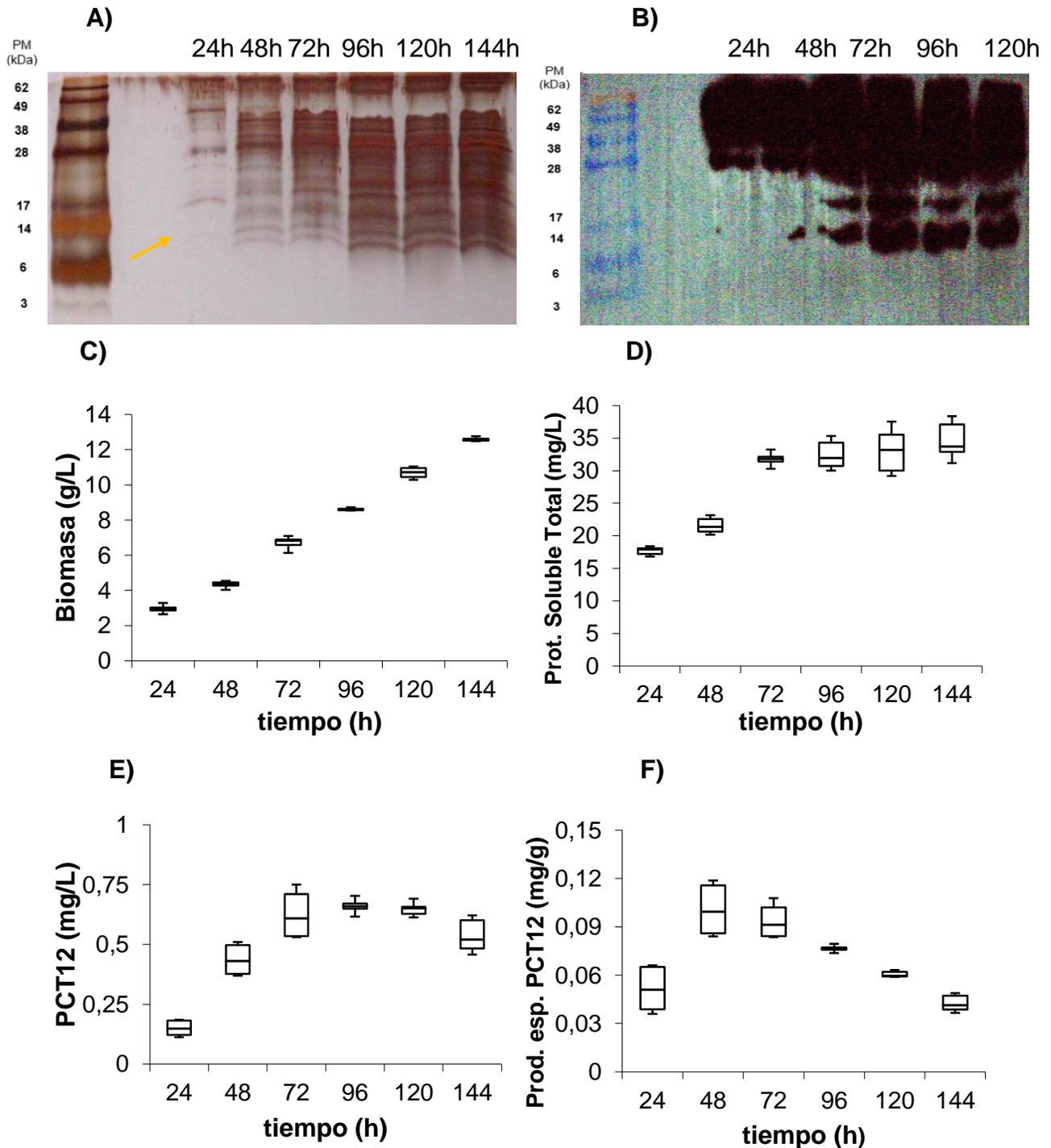


Figura 20. Cultivos en oxigenación moderada suplementados de *P. pastoris* que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP **A)** SDS-PAGE de sobrenadante; **carril 1:** Marcador de peso molecular, **carril 2:** vacío, **carriles 3 a 8:** muestras. **B)** Western blot de proteína intracelular. **C)** Cinética de crecimiento celular. **D)** Proteína soluble total en el sobrenadante. **E)** PCT12 en el sobrenadante. **F)** Producción específica de PCT12 por gramo de células. Condiciones de cultivo: medio mínimo SC 3% + 1% casaminoácidos, 25 ° C, 240 rpm.

Western blot de proteína en el sobrenadante

En el análisis por inmunodetección del sobrenadante se detectaron señales en los cultivos en condiciones de normoxia (Fig. 21) con aproximadamente un peso molecular de 30 y 45 kDa, sin embargo, estas bandas no corresponden al peso molecular teórico de la proteína de interés de 8 kDa. Una posible explicación a estas señales es el tratamiento que se utilizó para concentrar las muestras del sobrenadante con ácido tricloroacético que posiblemente provocó la agregación de la proteína de colágeno. Por otro lado, en los cultivos en oxigenación moderada no se detectaron señales a ninguno de los tiempos de cultivo, lo cual es probablemente a la baja concentración de PCT12 que se obtuvo en el sobrenadante.



Figura 21. Western blot de muestras del sobrenadante concentradas con TCA de cultivos de *P. pastoris* que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP. **Carriles 2-6:** Cultivos en oxigenación moderada; **Carriles 7-9:** Cultivos en normoxia. Condiciones de cultivo: medio mínimo SC 3% + 1% cas aminoácidos, 25 ° C, 240 rpm

DISCUSIÓN

Expresión de la PCT12 en tubos de ensayo y comparación de los promotores GTH1 y GAP

De acuerdo a la cinética de crecimiento celular, no se observaron diferencias significativas en la biomasa final de las cepas transformadas, De acuerdo a lo reportado por Prielhofer en 2013 tampoco se aprecia diferencia en el crecimiento de *P. pastoris* al utilizar estos dos promotores, sin embargo, hay que considerar que estos datos son de cultivos en lote alimentado. En cuanto a la producción de proteína total, tampoco se observa una diferencia entre los promotores. El promotor GTH1 se induce completamente al presentarse condiciones limitantes de glucosa, a una concentración menor de 0.05 g/L (Prielhofer et al., 2013), por lo tanto se esperaría observar una mayor concentración de proteína una vez se agota esta fuente de carbono. Al considerar el comportamiento del crecimiento celular y los experimentos de consumo de fuente de carbono en matraz agitado se puede asumir que esta condición de limitación de glucosa ocurre a partir de las 48 horas de cultivo, aunque no se observa una mayor producción de proteína total en este intervalo para la cepa con promotor GTH1, debido posiblemente a una limitación en los nutrientes disponibles. Respecto al análisis por SDS-PAGE, se observó una banda adicional a la proteína de interés en el sobrenadante aproximadamente a 30 kDa, aparte de esta, no se observan otras bandas en el rango de peso molecular en que se resolvió el gel, lo cual sugiere que una gran parte de la proteína soluble total está compuesta por PCT12 en el sobrenadante aunque esto se tiene que verificar mediante otro tipo de técnica analítica, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad ya que la PCT12 esta fusionada al epítopo myc para el cual existen resinas anti-myc que permitirían purificar la proteína de interés. También se debe verificar la identidad de la PCT12 mediante la técnica de Western blot. La banda observada en el sobrenadante de la cepa control coincidió con el peso molecular de la banda observada en las cepas transformantes, por lo que se planteó inicialmente la hipótesis de que la muestra analizada no es una cepa nativa y podría estar expresando la PCT12. Dicha hipótesis se descartó cuando se cultivó nuevamente la cepa control (Fig. 17) y se verificó que no expresa la proteína de interés.

Se determinó continuar el estudio de la producción de la PCT12 bajo el promotor GAP considerando que una condición crítica requerida para que el promotor GTH1 esté activo es una baja concentración de glucosa (menor a 0.05 g/L) (Prielhofer et al., 2013). Esto implicaría un control riguroso de la concentración de la fuente de carbono y garantizar la homogeneidad del medio de cultivo. Para fines de un proceso industrial mantener esta condición podría dificultarse, considerando que se utilizaría una fermentación en lote alimentado en la cual se alcanzan altas densidades celulares, entonces, el cultivo requeriría una alimentación con una alta concentración de glucosa por lo que para garantizar el mezclado de la fuente de

carbono se requeriría una alta agitación y así alcanzar la homogeneidad de la fuente de carbono, por lo tanto, se elevaría el costo del proceso en términos energéticos.

Cultivo de la cepa que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP en matraz agitado.

La caracterización de la cepa que contiene el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP se realizó en matraces agitados con la finalidad de incrementar la agitación y con ello el oxígeno disuelto en el medio.

Se tomó en consideración que en los experimentos en tubo de ensayo se observó que la PCT12 era el componente principal de proteína soluble en el sobrenadante por lo que se generó la hipótesis de que un incremento en la concentración de proteína soluble total produce un incremento proporcional en la concentración de PCT12. Por lo anterior, se estableció aumentar la proteína soluble total en el sobrenadante variando las condiciones iniciales

El medio mínimo SC se modificó, añadiendo buffer de fosfatos pH 6.0. Este valor de pH es el reportado en la producción de varias proteínas recombinantes debido a que la actividad enzimática de las proteasas presentes en el medio de cultivo se reduce con este valor de pH (Looser et al., 2015; Shivanand & Jayaraman, 2011). Se observó un incremento de la concentración de proteína soluble total y la producción específica en un factor mayor a 2 respecto a los cultivos en tubo (Tabla 6). Ya que el aumento de la concentración de proteína soluble total se obtuvo modificando dos variables (fijando el valor de pH e incrementando la agitación) es necesario evaluar el efecto del pH *per se* en la producción de PCT12.

Por otra parte, se observó una tasa de crecimiento con un valor de 0.21 h^{-1} la cual es mayor que en los cultivos en tubos de ensayo y coincide con el valor de μ máxima alcanzada por *P. pastoris* (Looser et al., 2015). En este mismo experimento encontramos que la producción específica de proteína soluble total disminuyó respecto al tiempo de cultivo por lo cual se plantearon algunas hipótesis sobre este fenómeno. Por ejemplo, una hipótesis es la competencia energética entre las células que pueden expresar y las que no pueden expresar la PCT12, este planteamiento es poco probable ya que las cepas transformadas se cultivaron en medio con zeocina, por lo que nos da certeza que el plásmido con el gen de resistencia a este antibiótico se incorporó a la cepa (Mendoza-Cabrera, 2020). Por otra parte, también podría haber degradación de la proteína intra y extracelularmente.

Efecto de las condiciones iniciales de cultivo en la producción de proteína soluble total

Efecto de la temperatura en la producción de proteína soluble total.

Se propuso disminuir la temperatura de incubación con el objetivo de incrementar la producción de la proteína soluble total de la célula. En los cultivos a 25 ° C se alcanzó una mejora en el rendimiento respecto al cultivo a 30 ° C (Tabla 5). Este resultado coincide con estudios previos en los que se incrementó la expresión de proteína heteróloga extracelular hasta 2 veces más respecto a la temperatura de referencia de 30 ° C (Dragosits et al., 2009; Kaushik et al., 2016). Generalmente se atribuye la mejora en la producción de proteína recombinante por efecto de la disminución de la temperatura a una mayor viabilidad celular (Shi et al., 2003). También se sugiere que la reducción en el estrés por plegamiento de la proteína favorece una secreción más eficiente de la misma. Además se menciona una reducción en la concentración de chaperonas intracelulares lo que reduce la respuesta a proteínas mal plegadas (Gasser et al., 2008). Entre otros factores, se sugiere también que la estabilidad del mRNA a menor temperatura causa una mejor expresión de la proteína recombinante (Dragosits et al., 2009).

Efecto de la concentración de la fuente de carbono en la producción de proteína soluble total.

El efecto de la variación de la fuente de carbono (glucosa) sugiere un valor óptimo para la producción de proteína soluble total de 30 g/L sin embargo, no se obtuvo un incremento significativo como al incrementar la agitación o disminuir la temperatura. Se ha estudiado el efecto de la concentración de glucosa en levadura, detectando la expresión de proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo, así como un cambio en la expresión de proteínas del metabolismo energético lo cual refleja una adaptación del proteoma de la levadura bajo una alta concentración de glucosa (Guidi et al., 2010). Si bien hay que considerar que estos efectos se observaron a una concentración de 20 % de glucosa en el cultivo, la respuesta al estrés osmótico puede tener relación en la disminución de proteína soluble total observada a una concentración de glucosa de 4%.

Sin embargo, no fue posible visualizar la proteína de interés en el SDS-PAGE del sobrenadante (Anexo 2.2), cabe mencionar que el cultivo con las condiciones optimizadas tuvo una duración de 24 horas a diferencia de los cultivos en tubos de ensayo que duraron 96 horas, además, la cinética de consumo de la fuente de carbono muestra que la glucosa no se consumió completamente (Fig 18.B) lo cual mostró que el crecimiento celular aún no había alcanzado la fase estacionaria. Debido a esto se decidió extender el tiempo de cultivo para evaluar la secreción no asociada al crecimiento de la proteína de interés.

Adicionalmente se planteó la posibilidad de una inhibición del crecimiento celular debido a una oxigenación deficiente. Por lo anterior se disminuyó el volumen de medio de cultivo en los matraces con el objetivo de evaluar el efecto de la oxigenación en la producción de PCT12.

Efecto de la oxigenación en la producción de la PCT12

El incremento en la oxigenación mostró que la proteína recombinante es expresada en menor cantidad extracelularmente, por lo que no pudo ser detectada en el sobrenadante. Referente a este fenómeno se ha observado que el incremento en la oxigenación no favorece necesariamente la producción de proteína recombinante bajo el promotor GAP por lo que las condiciones limitantes de oxígeno deben ser evaluadas (Çalık et al., 2015). En la literatura se reporta que al mantener el oxígeno disuelto entre una condición limitante e hipoxia (8 a 15% de oxígeno disuelto) se obtienen mayores rendimientos de proteína recombinante (Baumann et al., 2010; Güneş & Çalık, 2016). También se ha reportado que durante condiciones de hipoxia se altera la composición de los lípidos en la célula, debido principalmente a las reacciones dependientes de oxígeno (desaturación de ácidos grasos y la síntesis de ergosterol) y disminución de niveles de inositol. Estos cambios activan la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), afectando el metabolismo de lípidos y la secreción de proteínas (Adelantado et al., 2017). Sin embargo tiene que considerarse que en la presencia de bajas cantidades de oxígeno, la respiración es reducida drásticamente y el metabolismo de la levadura es reprogramado para la asimilación de la fuente de carbono por vías fermentativas causando un aumento en el consumo de glucosa por unidad de biomasa lo cual resulta en la producción de subproductos en el sobrenadante como etanol y arabinol (Carnicer et al., 2009) lo cual hace menos eficiente la producción de proteína heteróloga.

Proteína PCT12 intracelular.

Los experimentos de western blot sugieren que la proteína recombinante se acumula intracelularmente ya que se detectaron señales de distinto peso molecular en el western blot, y posiblemente la proteína de interés se encuentra en varias formas inmaduras fusionada a la señal de secreción alfa antes de ser procesada y secretada por la célula. Se han descrito formas inmaduras de proteínas recombinantes fusionadas con el factor de secreción alfa, por ejemplo, al expresar interleucina-10 humana recombinante en *P. pastoris* (Zhong et al., 2014). La señal de secreción alfa consta de dos regiones: el péptido Pre que contiene 19 aminoácidos (2 kDa) y el péptido Pro con 67 aminoácidos (7 kDa). El procesamiento de esta secuencia alfa consiste en tres pasos principales, la remoción de la región Pre en el retículo endoplásmico (RE), el corte de la región Pro en el aparato de Golgi y finalmente el corte total de la región Pro (Chahal et al., 2017). También se ha reportado que la señal de secreción alfa contiene 3 sitios consenso de N-glicosilación donde se unen glicanos a la proteína (Zahrl et al., 2018). A su vez, cuando la proteína mal plegada es retenida en el aparato de Golgi se unen residuos

de manosa adicionales a los glicanos de la proteína (Kleizen & Braakman, 2004). Todo el procesamiento descrito anteriormente explica las distintas formas de la proteína PCT12 inmadura detectadas en la inmuno detección (Figura 18,19 y 20).

Considerando la intensidad de la señal observada en los experimentos de western blot que representa la proteína PCT12 inmadura al interior de la célula, nos lleva a pensar que el paso limitante para incrementar la producción de la proteína recombinante no es la traducción del mRNA de la PCT12 si no el procesamiento de la proteína en los organelos, la secreción de la proteína al medio de cultivo o bien su degradación extracelular.

La sobreproducción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* puede sobrecargar la capacidad de plegamiento y secreción del RE, lo que ocasiona la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) (Hoseki et al., 2010). En este sentido, existen reportes donde se estudia la sobre-expresión de proteínas involucradas en el plegamiento y secreción de proteínas, por ejemplo, el factor de transcripción Hac 1 que activa genes involucrado en la UPR, además de diferentes chaperonas como Kar2 y Pdi1 dando incrementos de 1.5 a 4 veces más en la producción de proteína recombinante (Puxbaum et al., 2015). Por otro lado, se ha reportado que la suplementación del medio de cultivo con casaminoácidos facilita la secreción de proteína recombinante, reduciendo la proporción retenida intracelularmente, incrementando la producción de proteína recombinante hasta 9 veces más comparando las condiciones no optimizadas (Kaushik et al., 2016).

Suplementación del medio de cultivo con casaminoácidos

De todos los parámetros de operación evaluados, la suplementación con casaminoácidos demostró mejorar en mayor medida la producción de proteína recombinante. Existen varios estudios en donde la adición de este componente al medio de cultivo mejora significativamente la producción de proteína recombinante y se asocia con la reducción en la actividad proteolítica extracelular (Pal et al., 2006). Se ha propuesto también que mejoran la secreción de proteína recombinante (Kaushik et al., 2016) sin embargo, el análisis por inmuno-detección en los cultivos con casaminoácidos muestra que aun gran cantidad de proteína es retenida intracelularmente (Fig. 22B), comparados con experimentos previos en medio mínimo. Considerando lo anterior, no es posible afirmar que mejoró la secreción de la proteína recombinante en el cultivo suplementado con aminoácidos. Por lo tanto, es posible que la mejora en la concentración de PCT12 en el sobrenadante se deba a mayor disponibilidad de precursores (mayor cantidad de aminoácidos) o una disminución en la actividad proteolítica en el sobrenadante e intracelularmente. Dado que hay más de 10 veces la cantidad de aminoácidos inicialmente en el medio de cultivo suplementado, es posible la primera hipótesis debido a una mayor disponibilidad de precursores para que la célula biosintetice la proteína recombinante. También hay que considerar el aumento en la biomasa final con el

medio suplementado, lo que indica que no todos los aminoácidos disponibles en el medio de cultivo son utilizados para la síntesis de proteína, sino como fuente de carbono para el crecimiento celular.

Por otro lado, algunos reportes sugieren el uso de casaminoácidos para proteger a la proteína recombinante de la degradación proteolítica (Goodrick et al., 2001) pues se ha reportado un nivel elevado de proteasas tanto en el citoplasma como en el medio de cultivo causado por el metabolismo celular y la lisis celular al final de la fermentación en cepas productoras de proteína recombinante (Sinha et al., 2005). Además hay que considerar que las proteasas están presentes no solo en la vacuola o lisosoma de la levadura sino en la ruta de secreción tardía (post Aparato de Golgi) y en la pared celular (Delic et al., 2014) por lo que es posible que los casaminoácidos reduzcan también esta actividad proteolítica intracelular adicionalmente a la actividad proteolítica extracelular.

En relación a los cultivos con oxigenación moderada suplementados, se esperaba que estas dos condiciones aumentaran la producción de PCT12, sin embargo, se obtuvo una menor concentración y producción específica de proteína recombinante, a pesar de que la proteína soluble total en el sobrenadante aumentó. El barrido de los carriles que se observa en el sobrenadante a partir del cuarto día en el SDS-PAGE sugiere actividad proteolítica, lo cual sea una explicación a este bajo rendimiento, sin embargo, se debe verificar esto con un ensayo específico para medir dicha actividad proteolítica. Se planteó la consideración de que los casaminoácidos son utilizados por la célula como fuente de carbono, ya que se obtuvo una mayor cantidad de biomasa final en el cultivo suplementado comparado con el cultivo sin casaminoácidos (Figuras 15.C y 19.C). Por lo anterior, es posible que en una fase avanzada de la fermentación los casaminoácidos se agoten, dando lugar a la actividad proteolítica.

En la Tabla 7 se muestran algunas proteínas expresadas constitutivamente bajo el promotor GAP. Se han reportado cultivos para expresar proteínas recombinantes en matraz agitado y en su mayoría utilizan medios de cultivo complejos como YPD, en estos casos se tratan de proteínas destinadas para uso terapéutico con un alto valor agregado como el antígeno de hepatitis B y la Interleucina-HSA obteniendo concentraciones entre 7 mg/L hasta 180 mg/L, respectivamente. En este proyecto se obtuvo una concentración de PCT12 cercana a 3 mg/L, es un rendimiento que aún puede mejorarse tomando en cuenta que se empleó un medio mínimo suplementado con un nutriente complejo. Considerando que la finalidad de producir la PCT12 es para consumo humano, es necesario estudiar su expresión con un medio mínimo definido para producirla en grandes cantidades a un bajo costo. Por este motivo se utilizó desde un principio el medio mínimo SC para la expresión de esta proteína, sin embargo, los experimentos realizados en este proyecto mostraron que la adición de casaminoácidos resulta favorable para mejorar la producción de PCT12. No obstante, el uso de este tipo de nutrientes no es ideal por su origen de fuente animal que puede encarecer el proceso y añaden cierta variabilidad en la

fermentación debido a la variación entre lotes del mismo nutriente. En este sentido se han desarrollado medios de cultivos optimizados para lograr mayor productividad de proteínas heterólogas. Matthews y colaboradores desarrollaron un medio rico definido (RDM) tras un estudio sistemático de los nutrientes presentes en medios complejos identificando aquellos que son críticos para el crecimiento celular ya que las formulaciones estándar de medios mínimos definidos carecen de nutrientes que aportan componentes complejos como la peptona y el extracto de levadura. Al usar este medio de cultivo optimizado se obtuvieron rendimientos de proteína recombinantes iguales o superiores comparados con medios complejos (Matthews et al., 2018).

También se ha utilizado el promotor constitutivo en medios de cultivo definidos para la expresión de enzimas como la quitinasa humana y la lipasa, obteniendo concentraciones de 300 mg/L y 3 g/L, respectivamente. Generalmente estas productividades se logran con cultivos en lote alimentado en biorreactores donde las condiciones de cultivo como temperatura, pH, agitación y oxigenación son mejor controladas que en cultivos en matraz.

Tabla 7 Ejemplos de proteínas recombinantes expresadas en *Pichia pastoris*

Proteína	Pro-motor	Medio de cultivo	Conc. Final de proteína	Tiempo de cultivo	Sistema	Referencia
Antígeno viral del dengue	AOX 1	BMM + casaminoácidos (0.25%-2%)	187 mg/L	6 días	Biorreactor	Kaushik 2016
Lipasa	GAP	Glucosa 550 g/L + Sales	3 g/L	72 h	Lote alimentado Biorreactor	Wang 2012
Antígeno Hepatitis B	GAP	YPD	7 mg / L	6 días	Lote en matraz	Vellanki 2006
Aqualisina	GAP	YPD	150 mg/L	72 h	Lote en matraz	Oledzka 2003
Quitinasa	GAP	Glucosa 500 g/L + cas-aminoácidos 1%	300 mg/L	120 h	Biorreactor	Goodrick 2001
IL-HSA	GAP	YPD	180 mg/L	48 h	Lote matraz	Guan 2013
PCTI y II	AOX 1	BSM + cas-aminoácidos 1%	14.8 g/L	96h	Biorreactor Lote alimentado	Werten 1999

Es importante considerar también la mejora de la cepa productora mediante ingeniería metabólica lo cual implica modificar la vía de secreción de proteínas, debido a que esta ruta metabólica no está evolutivamente adaptada a secretar altas cargas de proteína creando un “cuello de botella” metabólico. En la literatura se han revisado distintos tipos de estrategias para mejorar esta vía de secreción. Por ejemplo la co-expresión de chaperonas moleculares y proteínas relacionadas al plegamiento así como la delección de rutas que lleven al mal plegamiento, mal direccionamiento o a la degradación de las proteínas (Delic et al., 2014). Pfeffer y colaboradores reportaron que cerca del 60% del fragmento de anticuerpo (Fab) expresado en *Pichia pastoris* es degradado intracelularmente en lugar de ser secretado y demostraron que Fab interactúa con algunos componentes del proteosoma. Al utilizar un inhibidor proteosomal (MG-132) hay una mejora en niveles de producto secretado, lo que indica que el Fab recombinante se encuentra funcional y no mal plegado intracelularmente (Pfeffer et al., 2012) por lo que sugieren que el control de calidad en el RE es sobrepasado y activa la degradación asociada al retículo endoplásmico de proteínas (ERAD). En un estudio realizado por Zahrl y colaboradores compararon la expresión de la misma proteína Fab bajo dos distintos promotores (GAP y AOX1). Encontraron una fracción más grande de proteína localizada en el retículo endoplásmico de las células transformadas con el vector bajo el promotor de metanol en comparación con las células con el vector bajo el promotor GAP en el cual la proteína se encuentra en menor cantidad en el RE y ubiquitinada. Esto sugiere que en las células que expresan Fab con el plásmido bajo el promotor AOX1, una fracción más grande de Fab se encuentra en vía de ser secretada exitosamente y se propone que la mayor parte del anticuerpo Fab expresado por células con el plásmido bajo el promotor GAP es degradado antes de alcanzar el interior del RE. En lugar de atribuirlo a una insuficiente capacidad de plegamiento en el RE, se sugiere que la proteína se degrada antes de entrar a la vía secretoria (Zahrl et al., 2018).

Una posible explicación para la diferencia en la expresión de esta proteína bajo estos promotores es el efecto de la inducción por intervalos o pulsos al adicionar metanol al medio de cultivo, en contraste con el promotor GAP que continuamente expresa Fab recién sintetizado a la vía de secreción y esto mantiene las condiciones de estrés (Zahrl et al., 2018).

La producción en *Pichia pastoris* de la PCT12 con el promotor constitutivo GAP permitió identificar algunas condiciones del cultivo que permiten mejorar la producción de proteína, tales como la composición del medio de cultivo, temperatura y agitación. Si bien estas condiciones favorecieron la concentración de producto en el sobrenadante existen parámetros adicionales a mejorar reportados en la literatura tales como modificaciones metabólicas en la levadura, el uso de medios de cultivos optimizados y cepas deficientes en proteasas.

CONCLUSIONES

- No se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento, concentración de biomasa, proteína soluble final ni en la producción específica de proteína soluble total en los cultivos de las cepas con los promotores GTH1 y GAP, por lo que se eligió el promotor GAP considerando que su uso tiene más ventajas en un bioproceso.
- El cultivo de la cepa con el promotor GAP en matraz agitado incrementó la tasa de crecimiento y la producción de proteína soluble total
- La disminución de la temperatura de cultivo a 25 °C aumentó la proteína soluble total en el sobrenadante
- La variación de la fuente de carbono y biomasa inicial no tienen un efecto significativo en la producción específica de proteína soluble total
- El aumento de oxigenación del cultivo favorece la tasa de crecimiento y concentración de biomasa final, sin embargo, la concentración de proteína soluble total en el sobrenadante no mejoró.
- La disminución de oxigenación disminuye la tasa de crecimiento celular, aumenta la concentración de proteína soluble total en el medio mínimo e incrementa la producción de proteína que es retenida intracelularmente.
- La condición de oxigenación moderada favorece la secreción de proteína soluble total en el medio mínimo.
- La suplementación del medio de cultivo con casaminoácidos fue la condición que aumentó más la producción de proteína soluble total en el sobrenadante.
- Se establecieron condiciones de operación para un bioproceso de producción de PCT12 en el que se producen 3 mg/L a las 72 horas de cultivo los cuales representan 13 % de la proteína total del sobrenadante.

PERSPECTIVAS

- Comparar la producción de la PCT12 bajo el promotor inducible por metanol AOX1.
- Evaluar la producción de proteína recombinante en cepas deficientes de proteasas.
- Evaluar la producción con un medio de cultivo rico definido
- Realizar un cultivo en biorreactor para evaluar la producción de la PCT12 con el promotor GAP en condiciones más controladas de agitación, pH, temperatura y aireación.
- Incrementar el número de copias del gene de la PCT12 en las cepas productoras de *Pichia pastoris*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adelantado, N., Tarazona, P., Grillitsch, K., García-Ortega, X., Monforte, S., Valero, F., Feussner, I., Daum, G., & Ferrer, P. (2017). The effect of hypoxia on the lipidome of recombinant *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0699-4>
- Alberts, B., Johnson, A., & Lewis, J. (2002). Protein Function. In N. Y. G. Science (Ed.), *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26911/>
- Alcorta, A., Porta, A., Tárrega, A., Alvarez, M. D., & Vaquero, M. P. (2021). Foods for Plant-Based Diets: Challenges and Innovations. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/foods10020293>
- Aliu, E., Kanungo, S., & Arnold, G. L. (2018). Amino acid disorders. *Annals of Translational Medicine*, 6(24), 471. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.12.12>
- Anchel, D. (2016). *Method and composition for egg white protein production* (Patent No. PC/US20 15/060 146).
- Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., & Redwan, E. M. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, 13, 141. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>
- Barzel, U. S., & Massey, L. K. (1998). Excess dietary protein can adversely affect bone. *The Journal of Nutrition*, 128(6), 1051–1053. <https://doi.org/10.1093/jn/128.6.1051>
- Baumann, K., Carnicer, M., Dragosits, M., Graf, A. B., Stadlmann, J., Jouhten, P., Maaheimo, H., Gasser, B., Albiol, J., Mattanovich, D., & Ferrer, P. (2010). A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC Systems Biology*, 4, 141. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-141>
- Bender, D., & Mayes, P. (2012). Nutrición, digestión y absorción. In *Harper Bioquímica ilustrada* (29th ed., pp. 517–524). Mc Graw Hill.
- Boirie, Y. (2009). Physiopathological mechanism of sarcopenia. *JNHA - The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 13(8), 717–723. <https://doi.org/10.1007/s12603-009-0203-x>
- Buchetics, M., Dragosits, M., Maurer, M., Rebnegger, C., Porro, D., Sauer, M., Gasser, B., & Mattanovich, D. (2011). Reverse engineering of protein secretion by uncoupling of cell cycle phases from growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10), 2403–2412. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.23198>
- Cahill, G. F. (2006). Fuel Metabolism in Starvation. *Annual Review of Nutrition*, 26(1), 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.26.061505.111258>

- Çalık, P., Ata, Ö., Güneş, H., Massahi, A., Boy, E., Keskin, A., Öztürk, S., Zerze, G. H., & Özdamar, T. H. (2015). Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochemical Engineering Journal*, *95*, 20–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.12.003>
- Carnicer, M., Baumann, K., Töplitz, I., Sánchez-Ferrando, F., Mattanovich, D., Ferrer, P., & Albiol, J. (2009). Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different oxygen levels. *Microbial Cell Factories*, *8*(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-65>
- Caron, J., Domenger, D., Dhulster, P., Ravallec, R., & Cudennec, B. (2017). Protein Digestion-Derived Peptides and the Peripheral Regulation of Food Intake. *Frontiers in Endocrinology*, *8*, 85. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00085>
- Chahal, S., Wei, P., Moua, P., Park, S. P. J., Kwon, J., Patel, A., Vu, A. T., Catolico, J. A., Tsai, Y. F. T., Shaheen, N., Chu, T. T., Tam, V., Khan, Z.-E.-H., Joo, H. H., Xue, L., Lin-Cereghino, J., Tsai, J. W., & Lin-Cereghino, G. P. (2017). Structural characterization of the α -mating factor prepro-peptide for secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Gene*, *598*, 50–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.040>
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories*, *5*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-17>
- Delic, M., Göngrich, R., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2014). Engineering of protein folding and secretion-strategies to overcome bottlenecks for efficient production of recombinant proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, *21*(3), 414–437. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5844>
- Delimaris, I. (2013). Adverse Effects Associated with Protein Intake above the Recommended Dietary Allowance for Adults. *ISRN Nutrition*, *2013*, 126929. <https://doi.org/10.5402/2013/126929>
- Dragosits, M., Stadlmann, J., Albiol, J., Baumann, K., Maurer, M., Gasser, B., Sauer, M., Altmann, F., Ferrer, P., & Mattanovich, D. (2009). The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of Proteome Research*, *8*(3), 1380–1392. <https://doi.org/10.1021/pr8007623>
- Duda, K., Majerczak, J., Nieckarz, Z., Heymsfield, S. B., & Zoladz, J. A. (2019). *Chapter 1 - Human Body Composition and Muscle Mass* (J. A. B. T.-M. and E. P. Zoladz (ed.); pp. 3–26). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814593-7.00001-3>
- FAO. (2018). *Meat market review*.
- FAO. (2021). Meat. In *Agricultural outlook 2021-2030* (pp. 164–177).

- Fei, L., Wang, Y., & Chen, S. (2009). Improved glutathione production by gene expression in *Pichia pastoris*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(6), 729–735. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0297-x>
- Fraeye, I., Kratka, M., Vandeburgh, H., & Thorrez, L. (2020). Sensorial and Nutritional Aspects of Cultured Meat in Comparison to Traditional Meat: Much to Be Inferred. *Frontiers in Nutrition*, 7, 35. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00035>
- Garcia-Ortega, X., Ferrer, P., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2013). Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 172–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.07.013>
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez-Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, M. L., Mattanovich, D., & Villaverde, A. (2008). Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microbial Cell Factories*, 7, 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-11>
- Gaydhane, M. K., Mahanta, U., Sharma, C. S., Khandelwal, M., & Ramakrishna, S. (2018). Cultured meat: state of the art and future. *Biomanufacturing Reviews*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s40898-018-0005-1>
- Global Alliance for Human Nutrition. (2018). *Innovation profiles: Delphi Study on Nutrition Innovation*.
- Goodrick, J. C., Xu, M., Finnegan, R., Schilling, B. M., Schiavi, S., Hoppe, H., & Wan, N. C. (2001). High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnology and Bioengineering*, 74(6), 492–497. <https://doi.org/10.1002/bit.1140>
- Gu, L., Zhang, J., Liu, B., Du, G., & Chen, J. (2015). High-Level Extracellular Production of Glucose Oxidase by Recombinant *Pichia Pastoris* Using a Combined Strategy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(3), 1429–1447. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1387-z>
- Guedes, R. L. M., Prosdocimi, F., Fernandes, G. R., Moura, L. K., Ribeiro, H. A. L., & Ortega, J. M. (2011). Amino acids biosynthesis and nitrogen assimilation pathways: a great genomic deletion during eukaryotes evolution. *BMC Genomics*, 12(4), S2. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-S4-S2>
- Guidi, F., Magherini, F., Gamberi, T., Borro, M., Simmaco, M., & Modesti, A. (2010). Effect of different glucose concentrations on proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(7), 1516–1525. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.03.008>
- Güneş, H., & Çalık, P. (2016). Oxygen transfer as a tool for fine-tuning recombinant protein production by *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate

- dehydrogenase promoter. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(7), 1061–1072. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1584-y>
- Gurramkonda, C., Polez, S., Skoko, N., Adnan, A., Gäbel, T., Chugh, D., Swaminathan, S., Khanna, N., Tisminetzky, S., & Rinas, U. (2010). Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-31>
- Hainer, B. L., Matheson, E., & Wilkes, R. T. (2014). Diagnosis, treatment, and prevention of gout. *American Family Physician*, 90(12), 831–836.
- Heyland, J., Fu, J., Blank, L. M., & Schmid, A. (2011). Carbon metabolism limits recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8), 1942–1953. <https://doi.org/10.1002/bit.23114>
- Hoseki, J., Ushioda, R., & Nagata, K. (2010). Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Journal of Biochemistry*, 147(1), 19–25. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp194>
- Hu, X.-Q., Chu, J., Zhang, Z., Zhang, S.-L., Zhuang, Y.-P., Wang, Y.-H., Guo, M.-J., Chen, H.-X., & Yuan, Z.-Y. (2008). Effects of different glycerol feeding strategies on S-adenosyl-L-methionine biosynthesis by P(GAP)-driven *Pichia pastoris* overexpressing methionine adenosyltransferase. *Journal of Biotechnology*, 137(1–4), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.04.009>
- Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A.-K., Martinelle, M., & Enfors, S.-O. (2003). Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of Biotechnology*, 102(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(03\)00003-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(03)00003-8)
- Jia, B., & Jeon, C. O. (2020). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology*, 6(8), 160196. <https://doi.org/10.1098/rsob.160196>
- Kalhan, S. C. (2000). Protein metabolism in pregnancy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(5), 1249S–1255S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.5.1249s>
- Katsanos, C. S., Chinkes, D. L., Paddon-Jones, D., Zhang, X., Aarsland, A., & Wolfe, R. R. (2008). Whey protein ingestion in elderly persons results in greater muscle protein accrual than ingestion of its constituent essential amino acid content. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 28(10), 651–658. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.06.007>
- Kaushik, N., Rohila, D., Arora, U., Raut, R., Lamminmäki, U., Khanna, N., & Batra, G. (2016). Casamino acids facilitate the secretion of recombinant dengue virus serotype-3 envelope domain III in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnology*, 16, 12. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0243-3>

- Kleizen, B., & Braakman, I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(4), 343–349. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.012>
- Li, Z., Xiong, F., Lin, Q., d’Anjou, M., Daugulis, A. J., Yang, D. S., & Hew, C. L. (2001). Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 21(3), 438–445. <https://doi.org/10.1006/prev.2001.1395>
- Lippi, G., Mattiuzzi, C., & Cervellin, G. (2016). Meat consumption and cancer risk: a critical review of published meta-analyses. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 97, 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.11.008>
- Liu, W.-C., Gong, T., Wang, Q.-H., Liang, X., Chen, J.-J., & Zhu, P. (2016). Scaling-up Fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement. *Scientific Reports*, 6(1), 18439. <https://doi.org/10.1038/srep18439>
- Liu, W.-C., Inwood, S., Gong, T., Sharma, A., Yu, L.-Y., & Zhu, P. (2019). Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(2), 258–271. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1554620>
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D., & Kovar, K. (2015). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, 33(6, Part 2), 1177–1193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>
- Lynch, S. A., Mullen, A. M., O’Neill, E., Drummond, L., & Álvarez, C. (2018). Opportunities and perspectives for utilisation of co-products in the meat industry. *Meat Science*, 144, 62–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.019>
- Massey, K. A., Blakeslee, C. H., & Pitkow, H. S. (1998). A review of physiological and metabolic effects of essential amino acids. *Amino Acids*, 14(4), 271–300. <https://doi.org/10.1007/BF01318848>
- Mathews, C., Van Holde, K., & Appling, D. (2013). *Biochemistry* (Pearson (ed.); 4th ed.).
- Matthews, C. B., Kuo, A., Love, K. R., & Love, J. C. (2018). Development of a general defined medium for *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(1), 103–113. <https://doi.org/10.1002/bit.26440>
- Mendoza-Cabrera, S. N. (2020). *Expresión Hetróloga de proteínas diseñadas para consumo humano*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Michals, K. (2001). Developments in Phenylketonuria. *Topics in Clinical Nutrition*, 16(4). <https://journals.lww.com/topicsinclinicalnutrition/Fulltext/2001/16040/Developm>

ents_in_Phenylketonuria.6.aspx

- Nielsen, J. (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered*, 4(4), 207–211. <https://doi.org/10.4161/bioe.22856>
- NIH. (2017). *Chemicals in Meat Cooked at High Temperatures and Cancer Risk*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/diet/cooked-meats-fact-sheet>
- Paddon-Jones, D., & Leidy, H. (2014). Dietary protein and muscle in older persons. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 17(1), 5–11. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000011>
- Pal, Y., Khushoo, A., & Mukherjee, K. J. (2006). Process optimization of constitutive human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) expression in *Pichia pastoris* fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(6), 650–657. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0018-6>
- Pandya, R., Gandhi, P., & Ji, S. (2017). *Food composition comprising one or both of recombinant beta-lactoglobulin protein and recombinant alpha-lactalbumin protein* (Patent No. US 9,924,728 B2).
- Pfeffer, M., Maurer, M., Stadlmann, J., Grass, J., Delic, M., Altmann, F., & Mattanovich, D. (2012). Intracellular interactome of secreted antibody Fab fragment in *Pichia pastoris* reveals its routes of secretion and degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2503–2512. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3933-3>
- Poore, J., & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360(6392), 987 LP – 992. <https://doi.org/10.1126/science.aaq0216>
- Price, M. N., Zane, G. M., Kuehl, J. V., Melnyk, R. A., Wall, J. D., Deutschbauer, A. M., & Arkin, A. P. (2018). Filling gaps in bacterial amino acid biosynthesis pathways with high-throughput genetics. *PLoS Genetics*, 14(1), e1007147–e1007147. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007147>
- Prielhofer, R., Maurer, M., Klein, J., Wenger, J., Kiziak, C., Gasser, B., & Mattanovich, D. (2013). Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 12, 5. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-5>
- Puxbaum, V., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2015). Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7), 2925–2938. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6470-z>
- Rand, W. M., Pellett, P. L., & Young, V. R. (2003). Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(1), 109–127.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/77.1.109>

- Rischer, H., Szilvay, G. R., & Oksman-Caldentey, K.-M. (2020). Cellular agriculture — industrial biotechnology for food and materials. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 128–134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.003>
- Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M., & Wiebe, M. G. (2017). Single Cell Protein—State-of-the-Art, Industrial Landscape and Patents 2001–2016. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2009. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>
- Rodgers, K. J., Samardzic, K., & Main, B. J. (2017). *Toxic Nonprotein Amino Acids BT - Plant Toxins* (C. R. Carlini & R. Ligabue-Braun (eds.); pp. 263–285). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6464-4_9
- Samtiya, M., Aluko, R. E., & Dhewa, T. (2020). Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-0020-5>
- Sanders, C. L., Wengreen, H. J., Schwartz, S., Behrens, S. J., Corcoran, C., Lyketsos, C. G., Tschanz, J. T., & Investigators, C. C. (2018). Nutritional Status is Associated With Severe Dementia and Mortality: The Cache County Dementia Progression Study. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 32(4), 298–304. <https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000274>
- Sato, H., Tsukamoto-Yasui, M., Takado, Y., Kawasaki, N., Matsunaga, K., Ueno, S., Kanda, M., Nishimura, M., Karakawa, S., Isokawa, M., Suzuki, K., Nagao, K., Higuchi, M., & Kitamura, A. (2020). Protein Deficiency-Induced Behavioral Abnormalities and Neurotransmitter Loss in Aged Mice Are Ameliorated by Essential Amino Acids. *Frontiers in Nutrition*, 7, 23. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00023>
- Shi, X., Karkut, T., Chamankhah, M., Alting-Mees, M., Hemmingsen, S. M., & Hegedus, D. (2003). Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 28(2), 321–330. [https://doi.org/10.1016/s1046-5928\(02\)00706-4](https://doi.org/10.1016/s1046-5928(02)00706-4)
- Shivanand, P., & Jayaraman, G. (2011). Isolation and characterization of a metal ion-dependent alkaline protease from a halotolerant *Bacillus aquimaris* VITP4. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 48(2), 95–100.
- Sinha, J., Plantz, B. A., Inan, M., & Meagher, M. M. (2005). Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon- τ . *Biotechnology and Bioengineering*, 89(1), 102–112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.20318>
- Souza, A. L., Fiorini Aguiar, S. L., Gonçalves Miranda, M. C., Lemos, L., Freitas Guimaraes, M. A., Reis, D. S., Vieira Barros, P. A., Veloso, E. S., Carvalho, T. G., Ribeiro, F. M., Ferreira, E., Cara, D. C., Gomes-Santos, A. C., & Faria, A. M. C. (2017). Consumption of Diet Containing Free Amino Acids Exacerbates

- Colitis in Mice. *Frontiers in Immunology*, 8, 1587. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01587>
- Springmann, M., Clark, M., Mason-D’Croze, D., Wiebe, K., Bodirsky, B. L., Lassaletta, L., de Vries, W., Vermeulen, S. J., Herrero, M., Carlson, K. M., Jonell, M., Troell, M., DeClerck, F., Gordon, L. J., Zurayk, R., Scarborough, P., Rayner, M., Loken, B., Fanzo, J., ... Willett, W. (2018). Options for keeping the food system within environmental limits. *Nature*, 562(7728), 519–525. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0594-0>
- Tomé, D. (2013). Digestibility Issues of Vegetable versus Animal Proteins: Protein and Amino Acid Requirements—Functional Aspects. *Food and Nutrition Bulletin*, 34(2), 272–274. <https://doi.org/10.1177/156482651303400225>
- Tomé, D. (2018). Protein: what’s on in research on clinical nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 72(9), 1215–1220. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0240-9>
- Tomé, D., & Bos, C. (2000). Dietary Protein and Nitrogen Utilization. *The Journal of Nutrition*, 130(7), 1868S-1873S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.7.1868S>
- van Wegberg, A. M. J., MacDonald, A., Ahring, K., Bélanger-Quintana, A., Blau, N., Bosch, A. M., Burlina, A., Campistol, J., Feillet, F., Giżewska, M., Huijbregts, S. C., Kearney, S., Leuzzi, V., Maillot, F., Muntau, A. C., van Rijn, M., Trefz, F., Walter, J. H., & van Spronsen, F. J. (2017). The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0685-2>
- Vestergaard, M., Chan, S. H. J., & Jensen, P. R. (2016). Can microbes compete with cows for sustainable protein production - A feasibility study on high quality protein. *Scientific Reports*, 6(1), 36421. <https://doi.org/10.1038/srep36421>
- Vieira Gomes, A. M., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F., & Parachin, N. S. (2018). Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms*, 6(2), 38. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020038>
- Waltz, E. (2021). No bones, no scales, no eyeballs: appetite grows for cell-based seafood. In *Nature biotechnology* (Vol. 39, Issue 12, pp. 1483–1485). <https://doi.org/10.1038/d41587-021-00022-6>
- Wang, X., Sun, Y., Ke, F., Zhao, H., Liu, T., Xu, L., Liu, Y., & Yan, Y. (2012). Constitutive expression of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in *Pichia pastoris* using GAP as promoter. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(5), 1355–1367. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9524-4>
- WHO. (2007). *Protein and amino acid requirements in human nutrition*.
- Williams, R. A., Mamotte, C. D. S., & Burnett, J. R. (2008). Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 29(1), 31–41. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18566668>

- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>
- Wu, G., Bazer, F. W., Dai, Z., Li, D., Wang, J., & Wu, Z. (2014). Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2, 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114113>
- Yang, J., Cai, H., Liu, J., Zeng, M., Chen, J., Cheng, Q., & Zhang, L. (2018). Controlling AOX1 promoter strength in *Pichia pastoris* by manipulating poly (dA:dT) tracts. *Scientific Reports*, 8(1), 1401. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19831-y>
- Zahrl, R. J., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2018). The impact of ERAD on recombinant protein secretion in *Pichia pastoris* (syn *Komagataella* spp.). *Microbiology (Reading, England)*, 164(4), 453–463. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000630>
- Zhang, A. L., Zhang, T. Y., Luo, J. X., Chen, S. C., Guan, W. J., Fu, C. Y., Peng, S. Q., & Li, H. L. (2007). Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* by high-density cell culture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(2), 117–122. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0175-3>
- Zhong, Y., Yang, L., Guo, Y., Fang, F., Wang, D., Li, R., Jiang, M., Kang, W., Ma, J., Sun, J., & Xiao, W. (2014). High-temperature cultivation of recombinant *Pichia pastoris* increases endoplasmic reticulum stress and decreases production of human interleukin-10. *Microbial Cell Factories*, 13, 163. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0163-7>

ANEXOS

Anexo 1

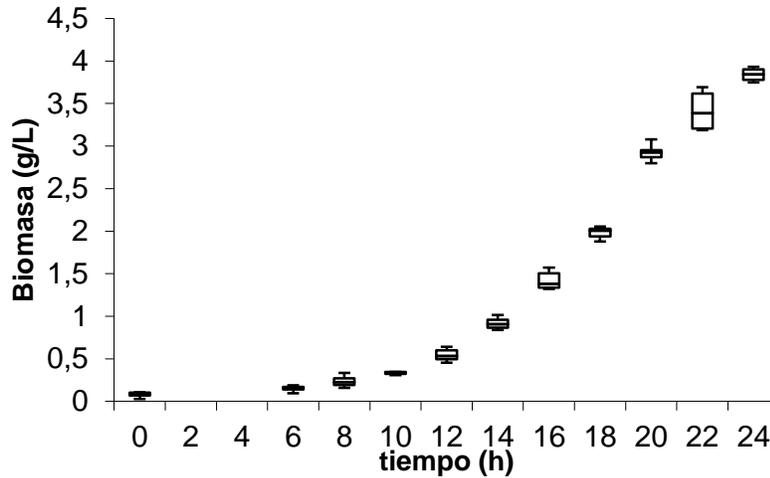


Figura A 1.1. Cinética de crecimiento celular de la cepa de *Pichia pastoris* que expresa la proteína PCT12 bajo el promotor constitutivo GAP en matraces agitados. Condiciones: 30°C, 240 rpm, fuente de carbono inicial = 20 g/L, D.O. inicial= 0.1 U.A.

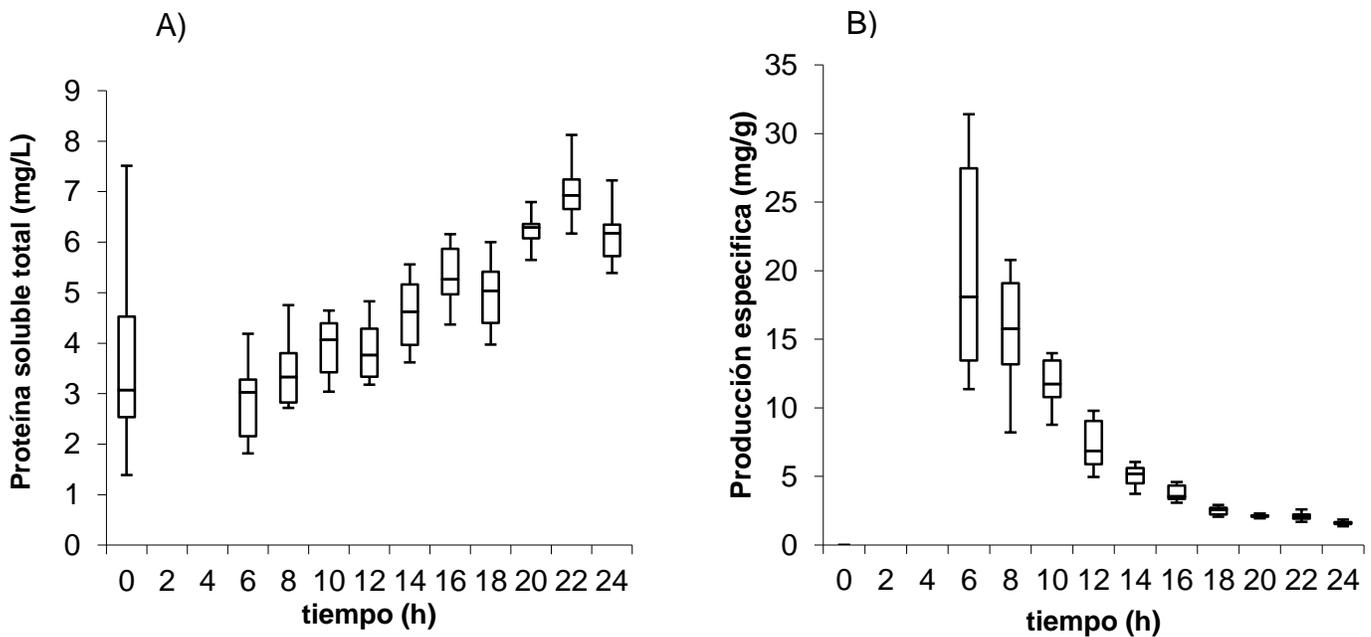


Figura A 1.2. A) Concentración de proteína soluble total en el sobrenadante y B) Producción específica de proteína soluble total en cultivos de *Pichia pastoris* que expresa la proteína PCT12 bajo el promotor constitutivo GAP en matraces agitados. Condiciones 30°C, 240 rpm, fuente de carbono inicial = 20 g/L, D.O. inicial= 0.1

Anexo 2

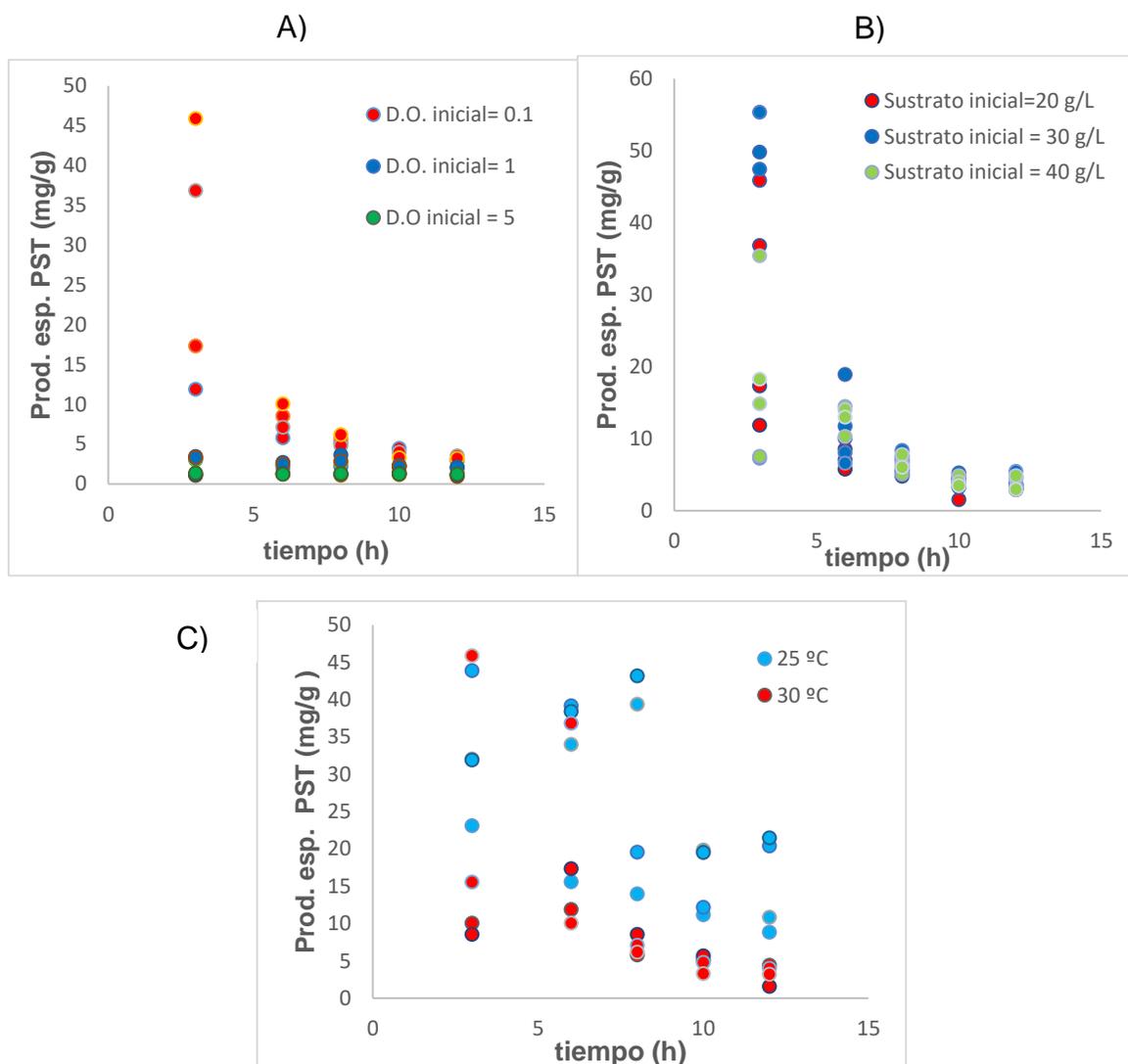


Figura A.2.1 Variación de condiciones iniciales en cultivos de *P. pastoris* que expresa la PCT12 bajo el promotor constitutivo GAP.

A) Efecto de la cantidad biomasa inicial en la producción específica de proteína soluble total (PST). Condiciones: 30 ° C, 240 rpm, fuente de carbono inicial = 20 g/L

B) Efecto de la cantidad fuente de carbono inicial en la producción específica de proteína soluble total. Condiciones: 30 ° C, 240 rpm, Densidad óptica inicial = 0.1 U.A.

C) Efecto de la temperatura en la producción específica de proteína soluble total. Condiciones: 240 rpm, densidad óptica inicial = 0.1 U.A., fuente de carbono inicial = 20 g/L.

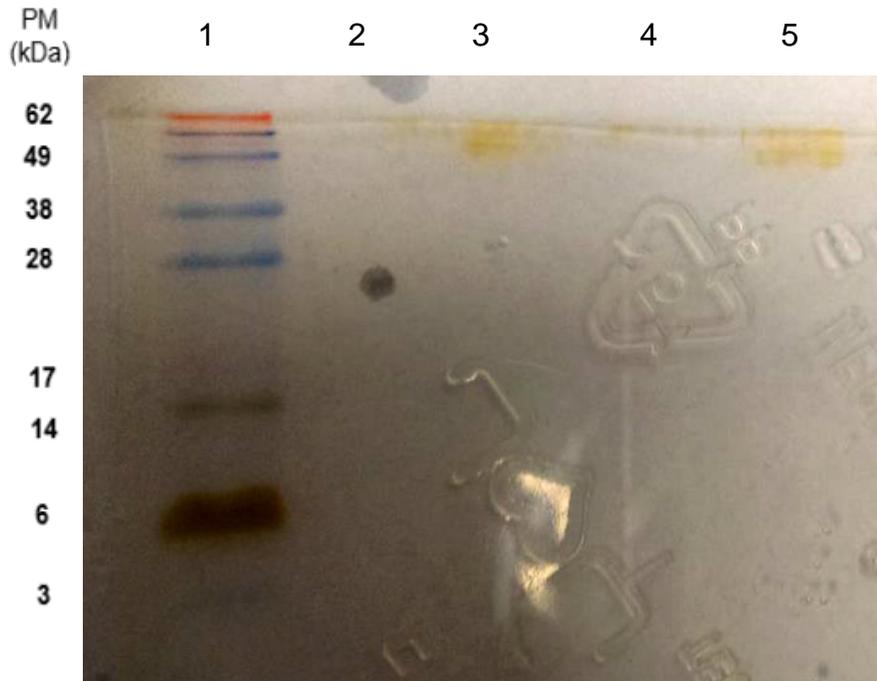


Figura A.2.2. SDS-PAGE de sobrenadante de cultivos de *P. pastoris* transformada con el plásmido que expresa la PCT12 bajo el promotor GAP en matraz agitado **Carril 1:** Marcador de peso molecular, **carriles 2 y 4:** vacío; **carriles 3 y 5:** sobrenadante t=24 h. Condiciones de cultivo: medio mínimo SC 3%, 25 ° C y 240 rpm.