



EXPRESIÓN DE IDURONATO 2-SULFATO SULFATASA HUMANA RECOMBINANTE (IDS_{hr}) EN *Pichia pastoris*

Raúl Alberto Poutou^{1,3}, Henry Córdoba^{1,2}, Balkys Esmeralda Quevedo³,
Patricia Landázuri⁴, Olga Yaneth Echeverri¹, Homero Sáenz^{1,5}, Adriana Vanegas¹,
Jovanna Acero¹, Adriana González¹, Jenny Herrera¹, Nestor Algesira⁶,
Luis Caicedo⁶, Luis Alejandro Barrera^{1*}

¹Instituto de Errores Innatos del Metabolismo.

²Departamento de Química.

³Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial, Departamento de Microbiología,
Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.

⁴Facultad de las Ciencias de la Salud Universidad Del Quindío, Armenia. Colombia.

⁵Decanato de Medicina. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela.

⁶Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C. Colombia.

E.mail: abarrera@javeriana.edu.co

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue expresar la enzima humana iduronato 2-sulfato sulfatasa en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. La deficiencia de esta enzima causa una enfermedad denominada Síndrome de Hunter. Siete clones fueron seleccionados por PCR (10, 28, 92, 94, 144, 149 y 153) al amplificar una banda de 826pb, indicativo de la presencia de la IDS_h y de la orientación del fragmento. Diferentes medios de cultivo se emplearon en la fase de crecimiento (YPG, YPGli y BMGliY), la fase de inducción fue llevada a cabo cambiando el medio de crecimiento por BMMY. Una vez crecido en YPGli, los clones 10, 28, 144, 149 y 153 mostraron actividad IDS de 1.53, 2.95, 4.35, 4.07 y 4.15 nmol/h mg a las 24, 48, 72 y 120h de inducción respectivamente. El clon 28 produjo 4.21nmol/h mg al crecer en YPG; sólo los clones 92 y 94 produjeron mejores actividades cuando se crecieron en BMGliY; reportando 1.62 y 1.20nmol/mg h respectivamente. La producción de la IDS_{hr} se logró en fermentador de 11, con medio salino (MBS-sF) con el clon IDS28. El crecimiento se realizó en cultivo discontinuo utilizando glicerol (fuente de carbono y energía) hasta obtener 12.08g/l de biomasa seca. Para el paso de inducción se utilizó un cultivo alimentado con metanol (<1% (v/v)); este último sirvió como fuente de carbono y energía e indujo la expresión de IDS_{hr} actuando sobre el promotor nativo *AOX1* presente en el constructo pPIC9-IDS_h. La actividad específica osciló entre 25.4 y 29.36 nmol/mg h. Se destaca que el valor de referencia de nuestro laboratorio para la IDS_h en plasma humano es 12.58 nmol/mg h.

Palabras clave: Proteínas recombinantes, *Pichia pastoris*, iduronato 2-sulfato sulfatasa, Síndrome de Hunter.

ABSTRACT

The main object of this work was to express the human enzyme iduronate 2-sulphate sulfatase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The enzyme deficiency causes Hunter Syndrome. Seven clones were selected by PCR (10, 28, 92, 94, 144, 149 y 153) by the amplification of 826bp band, indicating the presence of hIDS and the position of the fragment. Different culture media were employed in the growth phase (YPG, YPGly and BMGliY); the induction phase was triggered by changing the growth media to

BMMY. Once the clones 10, 28, 144, 149 y 153 were grown in YPGly, they showed an IDS activity of 1.53, 2.95, 4.35, 4.07 and 4.15 nmol/h mg at 24, 48, 72 and 120h of induction time respectively. Clone 28 produced 4.21nmol/h mg when growing in YPG; only clones 92 and 94 produced higher activities when grown in BMGlyY; with rates of 1.62 and 1.20nmol/mgh respectively. The production of hrIDS was carried out in an 1l fermentor with saline media (MBS-wF) and the clone IDS28. A batch culture was used for the growth phase by using glycerol (carbon and energy source) producing up to 12.08g/l of dry biomass. For the induction step a feed-batch culture with methanol (<1% (v/v)) was used; methanol provided the energy source and was acting upon the *AOX1* promoter of the genetic construction pPIC9-IDS_h inducing the hrIDS expression. The specific activity oscillated between 25.4 and 29.36 nmol/mg h. It is important to remark that the reference value of our laboratory for hIDS in the human plasma is about 12.58 nmol/mg h.

Key words: Recombinant proteins, *Pichia pastoris*, iduronate 2-sulfate sulfatase, Hunter Syndrome.

INTRODUCCIÓN

La familia de las sulfatasas está formada por un grupo de enzimas que comparten funciones y estructuras muy similares, catalizando la hidrólisis de los ésteres de sulfato de una gran variedad de compuestos entre los que se encuentran moléculas complejas como los glucosaminoglicanos (GAG) y moléculas más simples como los sulfolípidos. Esta relación estructura-función se refleja en el alto grado de similitud aminoacídica que existe entre los miembros de la familia (Parenti *et al*, 1997). La importancia de las sulfatasas como familia, radica en la relación de estas con varios desordenes genéticos humanos caracterizados por la acumulación anormal de compuestos sulfatados intermediarios, como resultado de la actividad deficiente de una o más sulfatasas (Ballabio and Shapiro, 1995; Kolodny and Fluharty, 1995; Neufeld and Muenzer, 1995; Parenti *et al*, 1997). Hasta 1997 nueve sulfatasas humanas con sus correspondientes genes se habían identificado; la mayoría de las cuales están ubicadas en los lisosomas; entre estas se encuentran la Arilsulfatasa A y B (ARSA, ARSB), Iduronato 2-sulfato sulfatasa (IDS), Galactosa 6-sulfatasa (GALNS) (Parenti *et al*, 1997). Varios genes codificantes de sulfatasas y provenientes de diferentes especies han sido clonados y el alineamiento de la secuencia proteica ha revelado un alto grado de identidad, particularmente

en la región amino-terminal (Nt), sugiriendo que las sulfatasas hacen parte de una familia de genes evolutivamente conservados y que probablemente comparten un ancestro común.

El Síndrome de Hunter es una de las siete mucopolisacaridosis (MPS II) conocidas y es causado por la deficiencia de la enzima lisosomal IDS. De este síndrome se conocen dos formas clínicas diferentes: la forma leve (MPSII B) y la severa (MPSII A), la forma leve se inicia lentamente durante los primeros años de la infancia; la inteligencia no es muy afectada y los compromisos esqueléticos y morfométricos comienzan a generar problemas hacia la segunda o tercera década de vida. La forma severa se caracteriza por una deficiencia mental severa y un retardo psicomotor pronunciado; como resultado de la acumulación de MPS. En la MPS II, las lesiones específicas de la piel son típicas; la hepato-esplenomegalia, las deformidades esqueléticas, la dilatación ventricular cerebral presentes en esta enfermedad son similares a las que se presentan en las demás MPS. Las vísceras están menos comprometidas que en otras MPS, la deposición de sustratos en el tejido conectivo y los huesos causa enanismo severo, restricción en el movimiento en los sistemas esquelético y tegumentario, mientras que en estados más avanzados, causa pérdida del movimiento ambulatorio y de la capacidad motora fina y gruesa. Hay ex-

creción urinaria de dermatán y heparán sulfato, lo cual es empleado para el diagnóstico, asociado a la determinación de la actividad enzimática en leucocitos y/o fibroblastos. La progresión de la enfermedad resulta en una morbi-mortalidad significativa en estos pacientes (Shapira *et al.*, 1989; Neufeld and Muenzer, 1995; Nyhan and Ozand, 1998; Yoskovitch *et al.*, 1998; Demitsu *et al.*, 1999). La incidencia de MPSII en Israel se ha reportado como 1: 34.000 hombres nacidos (Schaap and Bach 1980); en el Reino Unido, se estimó como 1: 132.000 (Young and Harper, 1982), donde la forma severa fue 3.38 veces más frecuente que la forma leve; en la Columbia Británica fue de 1:111.000 (Lowry *et al.*, 1990); en Colombia no existen reportes de prevalencia de la enfermedad. Hasta la fecha no existe un tratamiento para este síndrome; el trasplante de médula ósea ha sido la medida terapéutica empleada; no obstante, los resultados no han sido satisfactorios al no lograr la regresión de los síntomas ni detener la progresión de los mismos a largo plazo; estos procedimientos tampoco han tenido efecto alguno sobre el retardo mental. El intercambio de plasma generó un aumento en la actividad de la enzima plasmática sin demostrar beneficio clínico. Por otro lado el trasplante de fibroblastos histocompatibles, produjo un aumento en la actividad de la enzima acompañada por el correspondiente incremento en la degradación del heparán y el dermatán sulfato; situación que se mantuvo 2.5 y 3.7 años; con este tratamiento sólo se logró impedir la progresión del retardo mental de los pacientes (Dean *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1982; Nyhan and Ozand, 1998; Vellodi *et al.*, 1999; Kaye, 2001). El resultado del intercambio plasmático, sugiere que la enzima presente en el plasma es captada en baja concentración por las células de tejido conectivo, el hepatocito y las células del sistema retículo endotelial, ya que los receptores que median la endocitosis en cada una de las células mencionadas,

requieren que las proteínas a ser endocitadas tengan en la posición terminal de la secuencia de sus carbohidratos, manosa 6 fosfato, galactosa, manosa o N-acetilglucosamina respectivamente, pero la IDS presente en plasma presenta cadenas terminadas en ácido siálico (cambia el direccionamiento de la proteína), como fue sugerido por su movilidad electroforética después del tratamiento con la enzima desialidasa. Los datos en ambos estudios, intercambio por plasma y trasplante de fibroblastos, sugieren que el síndrome de Hunter podría responder al tratamiento con enzima exógena siempre y cuando tenga las características adecuadas para ser endocitada por los tejidos blanco del tratamiento (Furbish *et al.*, 1978; Neufeld and Aswell, 1980; Brown *et al.*, 1982).

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Se emplearon las siguientes cepas, *Pichia pastoris* GS115 (*his4*), (*Mut*⁺), los clones GS115/pPIC9-ALB, GS115/pPIC9 y 178 posibles clones de GS115/pPIC9-IDShr (Landázuri 2002), estos últimos conservados en agar MG (1.34% (p/v) yeast nitrogen base (YNB), 4×10^{-5} % (p/v) biotina, 2% p/v glucosa, 1.5% (p/v) agar-agar), (Invitrogen, 1996).

Aislamiento de ADN Cromosomal de *Pichia pastoris*

Los clones se cultivaron en 5ml de caldo MG (1.34% (p/v) YNB, 4×10^{-5} % p/v biotina, 2% (p/v) glucosa) a 30°C, 250 r.p.m., toda la noche. Los cultivos fueron centrifugados a 1000g, por 5' y las células lavadas con H₂O destilada estéril y centrifugadas nuevamente, luego resuspendidas en 300µl de tampón SCED (1M Sorbitol, 10mM citrato de sodio pH 7.5 ± 0.2, 10mM EDTA, 10mM DTT), seguidamente se añadieron 100µl de zymoliasa (0.3U/µl) y se incubó la mezcla a 37°C, 50'. Terminada la

incubación se añadió 300µl de SDS (1% (p/v)) se mezclaron moderadamente y se incubaron en hielo por 5'; pasado el tiempo se añadió 225µl de acetato de potasio (5M pH 8.9 ± 0.2), se mezcló y centrifugó a 8000g, 5'. El sobrenadante conteniendo el ADN cromosomal fue tratado con 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente por 15' y la mezcla fue centrifugada a 4°C, 8000g, por 20'. El precipitado resultante fue resuspendido en 105µl de TE 1X (10mM Tris-HCL pH 7.4 ± 0.2, 1mM EDTA pH 8 ± 0.2). El ADN resuspendido fue tratado con igual volumen de fenol-cloroformo (1:1 (v/v)), seguido de igual volumen de cloroformo-álcool isoamílico (24:1 (v/v)). La fase acuosa fue tratada con ½ volumen de acetato de amonio 7.5M pH 7.5 ± 0.2 y dos volúmenes de etanol absoluto e incubada a -20°C durante 60', previo a la centrifugación a 8000g, 4°C, 20'; el ADN precipitado fue lavado con etanol al 70% (v/v) y resuspendido en 50µl de Tampón TE 1X y conservados a -20°C (Invitrogen, 1996).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de la presencia del gen IDSh y de la orientación del mismo.

Se emplearon los iniciadores, IDSp2 (ATG CCG CCA CCC CGG ACC GGC CGA) y á-Factor (TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC). El volumen final de la reacción de PCR fue 25ml, (1X tampón de PCR, 1mM de MgCl₂, 0.1mM de cada dNTP, 40pmol de cada iniciador y 1U de TaqDNApol (Invitrogen), más 5ml de DNA). Se evaluó el DNA de los 178 clones conservados en MDagar (Landázuri 2002). La reacción de PCR se realizó en un termociclador BIO-RAD Gene.Cycler™, programado de la siguiente manera: 5' a 94°C, seguidos de 30 ciclos compuestos por 1' a 94°C, 1' a 47°C, 2' a 72 °C y un paso final de extensión de 7' a 72°C. Los productos de amplificación fueron visualizados en electroforesis hori-

zontal de agarosa 1% (p/v) en tampón TBE 1X (0.09M tris, 5.5g ácido bórico 0.002M EDTA pH 8 ± 0.2), teñidos con bromuro de etidio (5µg/ml), a 120 V, 1h y fotografiados bajo luz ultravioleta. Como marcador de talla molecular se empleó 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL) (Sambrook *et al*, 1989; Invitrogen, 1996; Landázuri 2002).

Determinación de azúcares reductores totales (g/l)

La concentración de azúcares reductores se determinó a través de la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Esta técnica permitió elaborar una curva de calibración empleando un patrón de glucosa de (5g/l); la reacción fue leída en Multiskan (MCC/340) a 540nm de longitud de onda, la curva de calibración cumplió con la siguiente ecuación: Glucosa (g/l) = (0.3161 x Abs_{540nm}) + 0.539, R² = 1.0000 (Miller 1959).

Determinación de la concentración de glicerol por HPLC

Se empleó una columna Shodex KC-811®, estireno-divinil benceno sulfonado, a 60°C, un detector de índice de refracción Waters® a de 40°C, como fase móvil se empleó agua a 1.2ml/min. El tamaño de muestra fue de 20l; la presión de trabajo de 270psi. Adicionalmente se empleó una pre-columna Shodex KC-G®. El tiempo de retención para glicerol, en estas condiciones, fue de 7.85'. Las muestras de fermentación fueron pre-tratadas con una columna de intercambio catiónico construida con 3ml de resina Dowex® 50W-X12. La columna fue activada con un volumen de HCl 1M, luego un volumen de NaOH 1M y nuevamente con un volumen de HCl 1M; posteriormente se lavó con agua destilada hasta alcanzar pH neutro. 300ml de muestra se pasaron a través de la columna, seguidos de 300µl de agua destilada; el volumen total obtenido (600µl), fue filtrado a través de una membrana de 0.2µ, antes de inyectar la muestra

en el HPLC. Para determinar la concentración del glicerol en la muestra se requirió de una curva de calibración descrita por la siguiente ecuación: Glicerol (g/l) = $1.31 \times 10^{-4} \times A$, $R^2 = 0.9973$ (Sreekrishna and Kropp 1996; Chiruvolu *et al.*, 1997; d'Anjou and Daugulis 2000; Boze *et al.*, 2001; Córdoba 2004).

Determinación de la concentración de metanol por cromatografía gaseosa

Se empleó una columna Nukol Supelco®, de 30m de longitud, diámetro interno 0.25mm y 0.25µm de espesor de película a una temperatura de 50°C. Temperatura del inyector 220°C. Se utilizó un detector FID a 240°C. La fase móvil fue Helio. Se trabajó con un patrón interno de isopropanol 0.1% (v/v), el cual fue mezclado con la muestra de fermentación en proporción 10:1. El tamaño de la muestra inyectada fue de 1µl. En estas condiciones el tiempo de retención del metanol es de 4.1min y el del isopropanol es de 4.5min. La muestra de fermentación fue pre-tratada según método establecido para la determinación de glicerol. Para determinar la concentración de metanol en la muestra se requirió de una curva de calibración de metanol de concentración conocida inferiores al 1% (v/v). La curva de calibración estuvo representada por la siguiente ecuación: metanol (%v/v) = $1.8951 \times A$, (A: cociente de áreas de metanol a isopropanol) $R^2 = 0.9994$ (Chiruvolu *et al.*, 1997; Crowley *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Almuzara *et al.*, 2002; Córdoba 2004).

Detección de la actividad enzimática IDS

La actividad de la IDS fue medida en los extractos crudos. Se tomaron 10µl de cada muestra y se mezclaron con 20µl del tampón (1.25 mM MU-αIdoA-2S diluido en tampón (0.1M CH₃COONa pH 5.0 ± 0.2, 10mM Pb (CH₃COO).3H₂O, 0.02% (p/v) NaN₃); la mezcla se incubó a 37°C, 4h; pa-

sado este tiempo se detuvo la reacción por adición de 40µl del tampón (0.4 M NaH₂PO₄ disuelto en 0.2M C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, pH 4.5 ± 0.2). Luego se añadió 20ml de LEBT (mezcla de enzimas lisosómicas de hígado de res); la mezcla se incubó nuevamente a 37°C, 24h. La nueva reacción se detuvo por la adición de 600l del tampón (0.5M Na₂CO₃ disuelto en NaHCO₃, pH 10.7 ± 0.2) y se leyó la fluorescencia en fluorómetro Turner modelo 450, a longitud de onda de excitación de 360nm y longitud de onda de emisión de 450nm (Shapira *et al.*, 1989; Voznyi *et al.*, 2001). La actividad IDS se reportó como nmol/h mg de proteína; para la determinación de actividad la concentración de proteínas se realizó por el método de Folin-Lowry (µg/ml = (0.0003 x Abs_{620nm}) + 0.0351, $R^2 = 1.0000$) (Lowry *et al.*, 1951; Shapira *et al.*, 1989; Pesce and Kaplan 1990).

Estudio del consumo de la fuente de carbono (glucosa o glicerol) en 100ml

Se partió de pre-cultivos en YPG (2% (p/v) peptona, 1% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) glucosa) luego las cepas se cultivaron en YPG, YPGli (2% (p/v) peptona, 1% (p/v) extracto de levadura, 1% (v/v) glicerol), MG y MGli (1.34% (p/v) YNB, 1% (v/v) glicerol; 4x10⁻⁵% (p/v) biotina). Las fermentaciones se realizaron en erlenmeyers de 500ml, (1/5), Dop_{inicial} a 620nm = 0.078, 30°C, 250 r.p.m. durante 24h. Se tomaron muestras del cultivo cada 2h. El extracto crudo fue empleado para medir el consumo de glucosa (DNS) ó glicerol (HPLC); la concentración de proteínas extracelulares fue seguida por Biuret a través de una curva de calibración (mg/ml = (0.091 x Dop_{540nm}) + 0.0013, $R^2 = 0.9987$); el peso seco fue calculado a través de una curva de calibración de Dop_{620nm} vs. Peso Seco (g/l = 1.1726 x Dop_{620nm}, $R^2 = 0.987$). Se calculó $\mu_{(x)}$, td, $Y_{(x/s)}$ y P (Miller 1959; Plummer 1981; Invitrogen. 1996; Doran 1998; Landázuri 2002).

Cuantificación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica fue medida en los extractos crudos según la técnica descrita por Hubner, U. 1993; la temperatura de incubación de las reacciones fue modificada a 30°C, teniendo en cuenta la temperatura de crecimiento y de producción de la enzima recombinante de *Pichia pastoris*. La actividad proteolítica (UP/ml min) fue calculada como 10UP/ml en 30 minutos, están representadas por 0.5 $D_{op_{260nm}}$ (Hubner 1993).

Estudio de la inducción de la expresión de IDShr en 100ml

Los clones seleccionados por PCR fueron cultivados de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio del consumo de la fuente de carbono, una vez cumplido el tiempo de cultivo en los medios YPG, YPGli y BMGliY (1% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) peptona, 100mM K_2HPO_4 pH 6.0 \pm 0.2, 1.34% (p/v) YNB, 4×10^{-5} % (p/v) biotina, 1% (v/v) glicerol), las células fueron centrifugadas aseptícamente, lavadas con NaCl 0.85% (p/v) y resuspendidas en igual volumen de BMMY; medio en el que se sustituye el glicerol del BMGliY por 0.5% (v/v) de metanol; el cual fue añadido periódicamente cada 24h durante 120h. Las condiciones de cultivo fueron 30°C, 250 rpm, durante 120h (Invitrogen. 1996; Landázuri 2002). Las muestras de fermentación fueron ensayadas para densidad óptica (DO_{620nm}), actividad proteolítica (UP/ml min), actividad IDS (nmol/mg proteína h), metanol (% (v/v)), proteínas (mg/ml), peso seco (g/l).

Estudio de la inducción de la expresión de IDShr en 1L

Los precultivos fueron desarrollados en tubos de 15ml con 3ml de YPG (relación 1/5 del aire), los cuales fueron inoculados con 300 μ l del Banco de Células Primario (BCP) e incubados a 30°C, 250 r.p.m., durante 42h.

Los inóculos del cultivo discontinuo fueron desarrollados en erlenmeyer agitado de 500ml con 100ml de medio MGLi durante 24h a 30°C y 250 r.p.m.. Se utilizó un birreactor Cole-Palmer® de 3litros para desarrollar el cultivo discontinuo; el volumen de trabajo fue 1l de medio básico salino modificado sin fosfatos (MBS-sF) (0.15g/l $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, 2.40g/l K_2SO_4 , 1.95g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.65g/l KOH, suplementado con 4ml de una solución de minerales (PTM1) compuesta de (0.5% (v/v) H_2SO_4 , 6g/l $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 3g/l $MnSO_4 \cdot H_2O$, 65g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 20g/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1g/l KI, 0.2g/l HBO_3 , 0.5g/l $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, 0.5g/l $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2g/l $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$). Se estudiaron concentraciones de glicerol entre 1 y 8% (v/v), a 30°C, pH 6.0 \pm 0.5 (controlado por adición de NH_4OH) (Sreekrishna and Kropp 1996), la agitación se fue variando entre 250 y 1000 r.p.m., la aireación osciló entre 2.0 - 2.5v.v.m. y los cultivos se extendieron entre 84 y 170h; en todos los casos la espuma fue controlada por la adición de ácido oleico. Entre 4.5 y 28ml de metanol fueron agregados cada 12 o 24h para inducir la expresión del promotor *AOX1*. El cultivo discontinuo fue seguido por densidad óptica, (DO_{620nm}), oxígeno disuelto (OD), pH, concentración del glicerol (g/l), concentración del metanol (% v/v), proteínas extracelulares totales (g/l), actividad proteolítica (UP/ml minuto) y actividad IDS (nmol/h mg de proteína); las muestras fueron tomadas cada 2h durante la fase del crecimiento (cuando el glicerol era la fuente del carbón, primeras 24h) y cada 12h durante la fase de la inducción (cuando el metanol era la fuente del carbono). Adicionalmente se calcularon parámetros cinéticos como productividad (p), rendimientos ($Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$); se aplicó el modelo de Monod para calcular la velocidad máxima de crecimiento específica ($\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})), la constante de la afinidad del sustrato (K_s (g/l)) para lo cual se aplicó la linealización propuesta por Lineaweaver-Burk. Todo lo anterior se realizó mediante

el paquete estadístico SIMFIT (Amador *et al.*, 1994; Poutou *et al.*, 1994; Invitrogen, 1996; Doran, 1998; Wolf *et al.*, 2001; Jahic *et al.*, 2002; Landázuri, 2002; Burquillo *et al.*, 2003; Córdoba *et al.*, 2003; Córdoba, 2004). Las condiciones detalladas de estos experimentos aparecen en la tabla 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se comenzó con 178 colonias de *Pichia pastoris* GS115 transformadas con el plásmido integrativo pPIC9-IDSh conservados en agar MG; cada uno de los clones fue cultivado en caldo MG sin histidina para presionar la selección de los recombinantes, empleando la técnica de parcheo; a partir de las células obtenidas se extrajo ADN genómico. El ADN de los 178 clones fue enfrentado a los iniciadores IDSp2 y α -Factor en una reacción de PCR. La figura 1 muestra la amplificación de un fragmento de ADN de aproximadamente 826pb correspondiente a 5 de los 7 clones que fueron identificados como positivos en este análisis; la nomenclatura de cada uno de ellos fue establecida al azar (IDS10, IDS28, IDS92, IDS94, IDS144, IDS149 e IDS153); la amplificación de este fragmento aseguró la integración del pPIC9-IDSh en el genoma de *Pichia pastoris* y al mismo tiempo confirmó la orientación correcta del ADNc de la IDSh, en relación al sentido de la transcripción, la posición del promotor empleado en la construcción (*AOXI*) y la secuencia terminadora de la transcripción (*AOXTT*) (Figura 2). Los iniciadores seleccionados hibridaron de forma específica en la región 3'OH de la secuencia codificante para el péptido señal α -Factor, entre los nucleótidos 1152 al 1172 (iniciador α -Factor) y entre los nucleótidos 732 al 769 del ADNc de IDSh (iniciador IDSp2). Adicionalmente el haber confirmado la presencia y orientación del gen, también confirmó la obtención de mutantes del tipo Mut⁺ His⁺, teniendo en cuenta el sitio de corte que fue empleado

para la linealización del vector de expresión antes de efectuar la transformación de la levadura (datos no mostrados) (Landázuri, 2002).

Los 7 clones obtenidos fueron conservados como Banco de Células Primario (BCP) en caldo selectivo MD, suplementado con 30% (v/v) de glicerol como crioprotectante a -70°C (Amador *et al.*, 1994; Poutou *et al.*, 1994; Meza *et al.*, 2004). Todos los clones positivos (3.9%) fueron ensayados para estudiar el consumo de fuentes de carbono como glicerol y glucosa; carbohidratos que formaron parte de medios selectivos y ricos como YPG, MG, BMGliY, YPGli y MGli, según se explicó con anterioridad en materiales y métodos. La tabla 1 muestra los resultados obtenidos en relación a la fase de crecimiento celular y a la fase de inducción por adición de metanol.

En la fase de crecimiento se logró determinar el tiempo mínimo necesario para consumir la mayor parte de la fuente de carbono; tiempo que marcó el momento de efectuar la inducción de la expresión por cambio de las células a medio suplementado con metanol; los ensayos de crecimiento inicial en BMGliY se hicieron durante 15h según recomendaciones del fabricante del estuche de clonación (Invitrogen 1996); para los medios suplementados con 1% (v/v) de glicerol el tiempo de consumo fue de 24 horas; sin embargo, variaciones en la concentración de sustrato residual inferiores al 10% no fueron consideradas consumo y por tanto no se calcularon los rendimientos correspondientes (Tabla 2). En los medios de cultivo donde se empleó glucosa como fuente de carbono los tiempos de consumo oscilaron entre 14 y 22 horas y en todos los casos el coeficiente de variación de la concentración de glucosa residual fue considerablemente superior al 10%, lo que sugiere una mejor asimilación de esta fuente de carbono, debido probablemente a la disponibilidad de oxígeno.

En relación a los rendimientos biomasa sustrato ($Y_{(x/s)}$) de la fase inicial de crecimiento (Tabla 2), se observó que los medios suplementados con glicerol reportaron rendimientos superiores, lo que puede justificarse con la entrada del glicerol directamente a la formación de triosas fosfatos como gliceraldehído 3-fosfato (GAP) y fosfato de di-hidroxiacetona (DHAP), lo que significa menor consumo de energía en los pasos de fosforilación de la aldohexosa; adicionalmente en los casos donde hubo consumo de la fuente de carbono, los medios ricos no selectivos reportaron mayor $Y_{(x/s)}$. La tabla 1 muestra que en la mayoría de los casos las velocidades específicas de crecimiento ($\mu_{(x)}$), la productividad de biomasa ($P_{(x)}$) y la concentración de proteínas extracelulares (PE TCS) fueron superiores en los medios ricos no selectivos, gracias a la disponibilidad de nutrientes. Los resultados obtenidos en los estudios de consumo de la fuente de carbono indicaron mayor producción de biomasa también en los medios ricos no selectivos (YPG, YPGli y BMGliY) por lo cual la fase de inducción fue estudiada únicamente en ellos. Las cepas GS115/pPIC9, GS115/pPIC9-Alb y GS115 fueron cultivadas de igual manera como controles para todos los ensayos de cultivo y analíticos.

Los resultados en la tabla 2 (fase de inducción) muestran la actividad IDS_{hr} de los clones IDS28 en YPG, IDS144, IDS149 e IDS153 en YPGli (4.213, 4.350, 4.070 y 4.150 nmol/h mg de proteína respectivamente); lo cual coincide con varios reportes de la literatura, donde se demuestra la utilidad del glicerol como sustrato de crecimiento de *Pichia pastoris* recombinantes (Córdoba *et al.*, 2003). En todos los casos el peso seco final de la fase de inducción se incrementó más de 2 veces en comparación con la fase de crecimiento, mostrando además, la habilidad de todas las cepas y clones en estudio para crecer en metanol. Los resultados obtenidos en esta escala demues-

tran dos cosas: primero, que el medio YPGli es más adecuado para la fase de crecimiento por los resultados superiores de actividad obtenidos, y, segundo, que el clon IDS28 aparenta ser el más estable en cuanto a actividad IDS bajo las condiciones de cultivos que se tenían hasta entonces; destacando actividades para este clon de 4.213 y 2.950 nmol h⁻¹ mg⁻¹ en los caldos YPG y YPGli respectivamente. La figura 3 muestra la variación del metanol residual en comparación con el metanol añadido al sistema cada 24h; como se aprecia el clon IDS28 muestra un mejor consumo de la fuente de carbono tanto en medio YPG o YPGli, por lo cual se seleccionaron estos medios y este clon para los experimentos en biorreactor de 3L. En los experimentos de inducción a escala de 100ml, la concentración de proteínas extracelulares y la actividad proteolítica se comportaron de manera estable (Tabla 2); sin embargo, las cepas que obtuvieron pesos secos mayores a las 120 horas expresaron menor actividad IDS en todos los medios ensayados, lo que sugirió que la adición del metanol fue un estímulo únicamente para el crecimiento en biomasa (datos no mostrados). De otro lado las cepas controles GS115/pPIC9 y GS115 no expresaron actividad IDS (resultados esperados), a pesar de haber sido sometidas a las mismas condiciones de inducción; la cepa control GS115/pPIC9-Alb expresó la albúmina humana entre 0.354mg/ml y 0.720mg/ml, dependiendo del medio de cultivo empleado (Tabla 2).

En los primeros experimentos en biorreactor de 3l se emplearon los medios de cultivo YPG y BMGliY y el clon IDS28 según se concluyó en el experimento anterior; teniendo en cuenta que el metabolismo del glicerol requiere mayor cantidad de oxígeno que el de la glucosa (Kobayashi *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2001); los resultados de actividad IDS obtenidos en BMGliY oscilaron entre 0.29 y 3.34 nmol/h mg de proteína, valores similares a los obtenidos

a escala de 100ml, la concentración de proteínas extracelulares osciló entre 0.28 y 13,08g/l (Tabla 2); resultados que sugieren que la concentración de proteínas extracelulares totales está enmascarada por la composición proteica de los medios de cultivos (peptona y extracto de levadura).

Otros autores han utilizado medios salinos (definidos) para el cultivo de *P. pastoris*, lo cual facilita las condiciones para la purificación de proteínas recombinantes extracelulares (Boze *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, 2001; Córdoba *et al.*, 2003). Por esta razón se ensayó el medio salino MBS-sF suplementado con 10, 20, 40 y 80g/l de glicerol (cultivos M6, M7, M8 y M9) según se describe en materiales y métodos (Tablas 1 y 3). En la figura 4 se muestra el comportamiento de los cultivos M6 a M9 y M13 (M13 es réplica de M7) a escala de 1l en reactor de 3l. La máxima actividad específica IDS se incrementó al cambiar las condiciones de cultivo, en M6 se detectó 15.5nmol/ h mg de proteína total y en M7 se detectó 29.36nmol/ h mg de proteína total, entre las 33 y 47h de cultivo respectivamente; en M8 la actividad disminuyó a 7.3nmol/ h mg de proteína total, a las 47h y en M9 el valor fue cero (Figura 4B). La disminución en la actividad IDS_{hr} observada en cada cultivo sugiere que se debe cuidar la concentración de metanol, la formación H₂O₂ así como la formación de etanol y acetato durante la fase de crecimiento (Inan and Meagher 2001), la disponibilidad de nutrientes, el pH y la actividad proteolítica.

En la figura 4C se observa en los cultivos M6 a M8 y M13 que cerca de las 35h se ha consumido la mayor parte del glicerol, momento en el que se comenzó la adición de metanol (Figura 4E). Las concentraciones de metanol de los cultivos M6, M7 a la hora de máxima actividad específica IDS fueron inferiores al 1% (v/v), mientras que en los cultivos M8 y M9 esta concentración alcanzó valores superiores (Figuras 4B

y E). Varios autores han estudiado el efecto de la variación en la concentración de metanol, en la expresión de proteínas recombinantes (Katakura *et al.*, 1998; Lin, 2000; Hong, 2002; Zhou and Zhang, 2002). La inducción del promotor AOX está fuertemente influenciada por el sustrato para el crecimiento; en células crecidas en glicerol, xilosa, ribosa o sorbitol la actividad específica de AOX es aproximadamente el 60% de la observada en metanol. La glucosa y el etanol son represores efectivos; en cultivos con glicerol la actividad AOX no se detecta, sin embargo esta fuente de carbono no reprime el sistema. Ciertos estudios donde se han ensayado de metanol y otras fuentes de carbono y energía (represoras) han demostrado que los efectos represor e inductor compiten. Cuando células crecidas en metanol pasan a glucosa o cuando existe limitación en iones NH₄²⁻ se ha observado la autofagia de los peroxisomas por procesos de proteólisis (Rose and Harrison, 1989; Sakai *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 1999). Para que la AOX sea activa requiere de un incremento en la síntesis de FAD⁺. La partición entre la cantidad de metanol que entra a la ruta oxidativa o a la ruta asimilatoria está controlado por la concentración de la AOX activa y la concentración de los sustratos y productos. La inactivación de AOX se ha observado en cultivos cuando súbitamente se incrementa la concentración de metanol; entonces la oxidación de metanol excede a la utilización del formaldehído con la consiguiente acumulación y la correspondiente inactivación de la enzima debida a la disociación de FAD⁺ y la célula eventualmente muere. La formación de formaldehído en la vía oxidativa debe controlarse a través de la regulación en la adición de metanol. De otro lado el proceso de regeneración y transporte de la xilulosa requiere ATP; luego condiciones de limitaciones de energía no favorecerán la formación de biomasa a diferencia de lo que ocurre con la ruta desasimilatoria de

oxidación, lo que podría explicar el escaso crecimiento observado en fase de inducción de los cultivos M6 a M9.

La disponibilidad de O_2 , PO_4^{2-} , SO_4^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , otros minerales y vitaminas en los cultivos de *P. pastoris* (Sreekrishna and Kropp, 1996; Higgins and Cregg, 1998), tiene un efecto importante sobre el crecimiento de levaduras (Rose and Harrison, 1989) pues es claro que la velocidad de síntesis de proteínas depende de la velocidad de crecimiento. Rose y Harrison (1989) han citado los trabajos desarrollados por Waldron y Lacroute en 1975, los que demostraron que la velocidad de síntesis de proteínas disminuye si desciende la velocidad de crecimiento y que no depende del número de ribosomas o la cantidad de ARNm, sino que refleja una disminución de la eficiencia ribosomal (Rose and Harrison, 1989). Elliot y McLaughlin en 1983 observaron que el número de ribosomas activos es constante a través del ciclo celular. En levaduras el control de la síntesis de proteínas es dependiente de los controles del ciclo celular, en la fase exponencial la síntesis de proteínas se incrementa exponencialmente; una vez que la célula entra a la fase estacionaria la síntesis de proteínas disminuye más del 90%. Después de las 30 horas de cultivo (fase de inducción con metanol) se observó que el crecimiento fue escaso (Figura 4A) (Elliot and McLaughlin, 1983; Curves *et al.*, 2002).

Los puntos donde la actividad proteolítica fue mayor contrastan con una baja actividad específica IDS (Figura 4F). La producción de proteasas en *P. pastoris*, ha sido estudiada bajo diferentes condiciones de crecimiento (pH, temperatura y densidad celular), y se ha observado que valores ácidos de pH estimulan la actividad proteolítica (Sreekrishna and Kropp, 1996; Inan *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2002). Algunos de nuestros resultados han mostrado

que a $pH 5 \pm 0.2$ no se detecta actividad IDS y que la actividad proteolítica ha sido elevada (resultados no mostrados), lo que se corrobora con algunos de los hallazgos de Jahic *et al.* (2002).

CONCLUSIONES

De los siete clones identificados por PCR, el clon 28 fue seleccionado para inducción en biorreactor por la asimilación de metanol y la expresión de IDShr a escala de 100ml. Los clones IDS144 e IDS153 requieren de estudios de adición de metanol y disponibilidad de O_2 . El clon IDS10 presenta un comportamiento “extraño” como si fuera Mut^s lo que no se corresponde con los experimentos de integración del pPIC9-IDS y por tanto requiere de estudios para estandarizar la adición de metanol. En este trabajo se logró expresar la IDShr con actividad entre 25.4 y 29.36nmol/h mg (M7 y M13) a concentración ~20g/l de glicerol como sustrato para la fase de crecimiento y con adición de metanol para la fase de inducción. Las relaciones entre el crecimiento del hospedero, la actividad y productividad de la enzima recombinante deberán ser el próximo tema de estudio. Creemos que para aumentar la actividad, es necesario desarrollar estrategias de alimentación de O_2 y CH_3OH . Los resultados obtenidos en la expresión de IDShr duplicaron los valores de referencia del laboratorio 12.58 nmol/mg h en plasma humano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Shunji Tomatsu de la Universidad de San Luis, Estados Unidos, por proveer la construcción pUC13-IDS, al Instituto Colombiano para la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas (COLCIENCIAS) (proyecto No. 1203-12-10410-192-2000), a la Pontificia Universidad Javeriana (proyectos No. 120104-O-0101103 y No. 12010F30401200) y a Genzyme

Corporation de los Estados Unidos por su apoyo financiero. Al departamento de Química de la de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, por facilitar el uso del cromatógrafo gaseoso y a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Colombia por facilitar el uso del reactor y el HPLC.

LITERATURA CITADA

- ALMUZARA, C., COS, O., BAEZA, M., GABRIEL, D., VALERO, F. 2002. Metanol Determination in *Pichia pastoris* Cultures by Flow Injection Analysis. *Biotechnology Letters* 24: 413-417.
- AMADOR, E., ALMAZAN, M., QUINTANA, M., POUTOU, R.A., CANDELARIO, M. 1994. Estudio Preliminar de la Estabilidad de los Bancos de Células Primarios para la Producción de Interferón alfa Recombinante. *Biotecnología Aplicada* 11 (1): 60-63.
- BALLABIO, A. and SHAPIRO, L.J. 1995. STS Deficiency and X-linked Ichthyosis. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Scriver, C.H., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. New York, McGraw-Hill: 2999-3022.
- BOZE, H., CELINE, L., PATRICK, C., FABIEN, R., CHRISTINE, V., YVES, C., GUY, M. 2001. High-level Secretory Production of Recombinant Porcine Follicle-Stimulating Hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* 36: 907-913.
- BROWN, F.R., HALL, C.W., NEUFELD, E.F., MUÑOZ, L.L., BRAINE, H., ANDRZEJEWSKY, S., CAMARGO, E.E., MARK, S.A., RICHARD, J.M., MOSER, H.W. 1982. Administration of Iduronate Sulfatase by Plasma Exchange to Patients with Hunter Syndrome. A Clinical Study. *American Journal of Medical Genetics* 13: 308-309.
- BURQUILLO, F.J., HOLGADO, M., BARDSLEY, W.G. 2003. Uso del Paquete Estadístico SIMFIT en la Enseñanza del Análisis de Datos en Ciencias Experimentales. *Journal of Science Education* 4 (1): 8-14.
- CHIRUVOLU, V., CREGG, J.M., MEAGHER, M.M. 1997. Recombinant Protein Production in an Alcohol Oxidase-Defective Strain of *Pichia pastoris* in Fedbatch Fermentations. *Enzyme Microbiology Technology* 21: 277-283.
- CÓRDOBA, H. 2004 Estudio de la Producción a Nivel de Laboratorio de la Enzima Iduronato 2-Sulfato Humana recombinante (IDS_{hr}) en *Pichia pastoris*. Facultad de Ingeniería Química. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C.
- CÓRDOBA, H., N., A., POUTOU, R.A., BARRERA, L.A. 2003. *Pichia pastoris* una Alternativa para la Producción de Glicoproteínas Humanas de Uso Terapéutico. Estrategias de Fermentación. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5 (2): 73-84.
- CROWLEY, J., MCCARTHY, B., NUNN, N.S., HARVEY, L.M., MCNEIL, B. 2000. Monitoring a Recombinant *Pichia pastoris* Fed Batch Process Using Fourier Transform Mid-infrared Spectroscopy (FT-MIRS). *Biotechnology Letters* 22: 1907-1912.
- CURVES, S., LINNEMANN, J., KLAUSER, T., WANDEY, C., TAKORS, R. 2002. Recombinant Protein Production with *Pichia pastoris* in Continuous Fermentation-Kinetic Analysis of Growth and Product Formation. *England Life Science* 2 (8): 229-235.
- D'ANJOU, M.C. and DAUGULIS, A.J. 2000. Mixed-Feed Exponential Feeding for

Fed-Batch Culture of Recombinant Methylotrophic Yeast. *Biotechnology Letters* 22: 341-346.

- DEAN, M.F., STEVENS, R.L., MUIR, H., BENSON, P.F., BUTTON, L.R., ANDERSON, R.L., BOLYSTON, A., MOWBRADY, J. 1979. Enzyme Replacement Therapy by Fibroblast Transplantation: Long-Term Biochemical Study in Three Cases of Hunter's Syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 63: 138-145.
- DEMITSU, T., KAKURAI, M., OKUBO, Y., SHIBAYAMA, C., KIKUCHI, Y., MORI, Y., SUKEGAWA, K., MIZUGUCHI, M. 1999. Skin Eruption as the Presenting Sign of Hunter Syndrome IIB. *Clinical and Experimental Dermatology* 24: 179-182.
- DORAN, P.M. 1998. *Principios De Ingeniería De Los Bioprocesos*. Zaragoza, Acribia S.A.
- ELLIOT, S.G. and McLAUGHLIN, C.S. 1983. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. New York, Academic Press.
- FURBISH, S.F., STEER, C.J., BARRANGER, J.A., JONES, E.A., BRADY, R.O. 1978. The Uptake of Native and Desialylated Glucocerebrosidase by Rat Hepatocytes and Kupffer Cells. *Biochemistry Biophysic Research Communication* 81: 1047-1053.
- HIGGINS, D.R. and CREGG, J.M. 1998. *Pichia* Protocols. Tootowa, New Jersey, Humana Press.
- HONG, F., MEINANDER, N.Q., JONSSON, L.J. 2002. Fermentation Strategies for Improved Heterologous Expression of Laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 79 (4): 438-449.
- HONG, Y., YU, S.S., KIM, J.-M., LEE, K., NA, Y.S., WHITLEY, C.B., SUGIMOTO, Y., KIM, S. 2002. Construction of a High Efficiency Retroviral Vector for Gene Therapy of Hunter Syndrome. *The Journal of Gene Medicine*.
- HUBNER, U. 1993. Production of Alkaline Serine Protease Subtilisin Calsbreg by *Bacillus licheniformis* on Complex Medium in a Stirred Tank Reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40: 182-188.
- INAN, M., CHIRUVOLU, V., ESKRIDGE, K.M., VLASUK, G.P., DICKERSON, K., BROWN, S., MEAGHER, M.M. 1999. Optimisation of Temperature-glycerol-pH Conditions for Fed-batch Fermentation Process for Recombinant Hookworm (*Ancylostoma caninum*) Anticoagulant Peptide (AcAP-5) Production by *Pichia pastoris*. *Enzyme Microbiology and Technology* 24: 438-445.
- INAN, M. and MEAGHER, M.M. 2001. The Effect of Ethanol and Acetate on Protein Expression in *Pichia pas toris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92 (4): 337-341.
- INVITROGEN 1996. *Pichia* Expression Kit. Protein Expression. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *P. pastoris*. Cat. No. K1710-01. California, Invitrogene.
- INVITROGEN. 1996. *Pichia* Expression Kit. Protein Expression. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *P. pastoris*. Cat. No. K1710-01. California, Invitrogene.
- JAHC, M., ROTTICCI-MULDER, J.C., MARTINELLE, M., HULT, K., ENFORS, S.O. 2002. Modeling of Growth and Energy Metabolism of *Pichia pastoris* Producing a Fusion Protein.

- Bioprocess Biocatalytic Engineering 24: 385-393.
- KATAKURA, Y., ZHANG, W., ZHUANG, G., OMASA, T., KISHIMOTO, M., GOTO, Y., SUGA, K.-I. 1998. Effect of Methanol Concentration on the Production of Human B2-Glycoprotein I Domain V by a Recombinant *Pichia pastoris*: A Simple System for The Control of Methanol Concentration Using a Semiconductor Gas Sensor. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86 (5): 482-487.
- KAYE, E.M. 2001. Lysosomal Storage Diseases. *Current Treatment Options in Neurology* 3: 249-256.
- KOBAYASHI, K., KUWAE, S., OHYA, T., OHDA, T., OHYAMA, M., OHI, H., TOMOMITSU, K., OHMURA, T. 2000. High-level Expression of Recombinant Human Serum Albumin from the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris* with Minimal Protease Production and Activation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89 (1): 55-61.
- KOLODNY, E.H. and FLUHARTY, A.L. 1995. Metachromatic Leukodystrophy and Multiple Sulfatase Deficiency: Sulfatide Lipidosis. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver, C.H., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. New York, McGraw-Hill. 3: 2693-2741.
- LANDÁZURI, P. 2002 Clonación Del cDNA de la Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa Humana. Expresión de la Enzima en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*. Instituto de Errores Innatos del Metabolismo. Tesis Doctoral. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C.
- LANGE, S., SCHMITT, J., SCHMID, R.D. 2001. High-yield Expression of the Recombinant, Atrazine-specific Fab Fragment K411B by the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Immunological Methods* 255: 103-114.
- LIN, J., PANIGRAPHY, D., TRINH, L.B., FOLKMAN, J., SHILOACH, J. 2000. Production Process for Recombinant Human Angiostatin in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24: 31-35.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., RANDALL, R. 1951. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- LOWRY, R.B., APPLGARTH, D.A., TOONE, J.R., MACDONALD, E., THUNEM, N.Y. 1990. An Update on the Frequency of Mucopolysaccharidoses Syndrome in British Columbia. *Human Genetic* 85: 389-390.
- MEZA, R.A., MONROY, A.F., MERCADO, M., POUTOU, R.A., RODRÍGUEZ, P., PEDROZA, A.M. 2004. Study of the Stability in Real Time of Cryopreserved Strain Banks. *UNIVERSITAS SCIENTIARUM* 9 (2): 35-42.
- MILLER, G. 1959. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 3: 426-428.
- NEUFELD, E. and MUENZER, J. 1995. The Mucopolysaccharidoses. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. Scriver, C.H., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. New York, McGraw-Hill. 3: 2645-2494.
- NEUFELD, E.F. and ASWELL, G. 1980. *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. New York, Plenum.
- NYHAN, W.L. and OZAND, P.T. 1998. Hunter Disease/Mucopolysaccharidoses Type II (MPSII) Iduronate Sulfatase

- Deficiency. Atlas of Metabolic Diseases. New York, Chapman and Hall Medical: 455-461.
- PARENTI, G., MERONI, G., BALLABIO, A. 1997. The Sulfatase Gene Family. Current Opinion in Genetic and Development 7: 386-391.
- PESCE, A.J. and KAPLAN, L.A. 1990. Proteínas de Líquido Cefalorraquídeo: Determinación Cuantitativa. Química Clínica-Métodos. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana. 11: 665-669.
- PLUMMER, D.T. 1981. Introducción a la Bioquímica Práctica. Bogotá, McGraw-Hill.
- POUTOU, R., AMADOR, E., CANDELARIO, M. 1994. Banco de Células Primarios (BCP): Caracterización y Papel en la Producción de Proteínas Recombinantes. Biotecnología Aplicada 11 (1): 55-59.
- ROSE, A.H. and HARRISON, J.S. 1989. The Yeast. Metabolism and Physiology of Yeast. London, Academic Press. 3.
- SAKAI, Y., KOLLER, A., RANGELL, L.K., KELLER, G.A., SUBRAMANI, S. 1998. Peroxisome Degradation by Microautophagy in *Pichia pastoris*: Identification of Specific Steps and Morphological Intermediates. Journal of Cell Biology 141 (3): 625-636.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. Plasmid Vectors. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1: 1-110.
- SCHAAP, T. and BACH, G. 1980. Incidence of Mucopolysaccharidoses in Israel: Hunter Disease a Jewish Disease. Human Genetic 56: 221-223.
- SHAPIRA, E., BLITZER, M., MILLER, J.B., AFRICK, D. 1989. Biochemical Genetics: A Laboratory Manual. New York, Oxford University Press: 50-51.
- SREEKRISHNA, K. and KROPP, K.E. 1996. *Pichia pastoris*. Nonconventional Yeast in Biotechnology. A Handbook. Wolf, K. Berlin, Springer Verlag: 203-253.
- VELLODI, A., YOUNG, E., COOPER, A., LIDCHI, V., WINCHESTER, B., WRAITH, J.E. 1999. Long-Term Follow-Up Following Bone Marrow Transplantation for Hunter Disease. Journal of Inherited and Metabolic Disease 22: 638-648.
- VOZNYI, Y.V., KEULEMANS, L.M., DIGGELEN, O.P. 2001. A Fluorogenic Enzyme Assay for the Diagnosis of MPS II (Hunter disease). Journal of Inherited Metabolism 24: 675-680.
- WOLF, A.M., HANSEN, O.C., POULSEN, U., MADRID, S., STOUGAARD, P. 2001. Optimization of the Production of *Chondrus crispus* Hexose Oxidase in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification 22: 189-199.
- YOSKOVITCH, A., TEWFIK, T.L., BROUILLETTE, R.T., SCHLOSS, M.D., DER KALOUSTIAN, V.M. 1998. Acute Airway Obstruction in Hunter Syndrome. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 44: 273-278.
- YOUNG, I.D. and HARPER, P.S. 1982. Incidence of Hunter's Syndrome. Human Genetic 60: 391-392.
- YUAN, W., STRØMHAUG, P.E., DUNN, W.A. 1999. Glucose-induced Autophagy of Peroxisomes in *Pichia pastoris* Requires a Unique E1-like Protein. Molecular Biology of the Cell 10: 1353-1366.
- ZHANG, W., BEVINS, M.A., PLANTZ, B.A., SMITH, L.A., MEAGHER, M.M. 2000. Modeling *Pichia pastoris* Growth on Methanol and Optimising the Production of a

Recombinant Protein, the Heavy-chain Fragment C of Botulinum Neurotoxin, Serotype A. *Biotechnology and Bioengineering* 70 (1): 1-8.

Recombinant Hirudin Produced by *Pichia pastoris* by Controlling the Specific Growth Rate. *Biotechnology Letters* 24: 1449-1453.

ZHOU, X.-S. and ZHANG, Y.-X. 2002. Decrease of Proteolytic Degradation of **Recibido: 6-10-2004**
Aceptado: 2-02-2005

TABLA 1. Condiciones experimentales iniciales de los cultivos en reactor de 3l (M6 - M9 y M13)

Condiciones Experimentales	Cultivos en Reactor de 3L				
	M6	M7	M8	M9	M13
Medio de Cultivo para el Inóculo	MGli	MGli	MGli	MGli	MGli
Medio de Cultivo para el Reactor de 3L	MBS-sF	MBS-sF	MBS-sF	MBS-sF	MBS-sF
DO inicial a 600 nm	0.565	0.251	0.242	0.270	0.296
Sustrato crecimiento (S) (% p/v) (Glicerol)	1.13	2.55	4.01	8.34	1.73
Sustrato inducción (S) (g) (Metanol)	35.15	40.54	30.53	17.08	105.24
Velocidad de agitación (r.p.m.)	250-700	250-900	250-950	300-1000	250-850
Flujo de aire (v.v.m.)	2.0	2.0	2.0 - 2.5	2.0 - 2.5	2.0

TABLA 2. Resumen de los estudios de consumo de la fuente de carbono y de la inducción de la expresión de IDShr a escala de 100ml

Cepas	Fase de Crecimiento										Fase de Inducción								
	Medio	$\mu_{(x)}$	td	CVCS	$Y_{(x/s)}$	$P_{(x)}$	TCS	PSTCS	PETCS		T.Máx. Act.	Act. IDS	PE	UP	PSfinal	CVCM	$\mu_{(x)}$	td	
		(h ⁻¹)	(h)	(%)	(g/g)	(g/l h)	(h)	(g/l)	(mg/ml)	Medio	(h)	nmol h ⁻¹ mg ⁻¹	(mg/ml)	ml ⁻¹ min ⁻¹	(g/l)	(%)	Global	(h ⁻¹)	(h)
IDS10	YPG	0.276	2.52	80.6	0.226	0.255	20	4.132	10.211	BMMY	72	1.173	4.170	4.669	7.227	108	0.024	28.41	
	YPGli	0.464	1.49	7.0		0.242	24	5.464	13.360		72	1.530	4.518	6.253	9.052	64	0.017	40.77	
	MGLi	0.187	3.71	15.9	0.360	0.171	24	4.186	0.730										
	MG	0.227	3.05	80.2	0.239	0.252	18	4.681	0.808										
	BMGliY	0.734	1.00	6.0		0.256	15	1.431	11.868		96	0.358	3.360	4.873	6.989	59	0.037	18.78	
IDS28	YPG	0.289	2.40	98.4	0.147	0.220	14	2.986	8.906	BMMY	72	4.213	4.670	4.724	7.665	81	0.031	22.58	
	YPGli	0.222	3.13	12.6	1.029	0.172	24	4.409	13.070		120	2.950	4.770	5.553	6.062	61	0.015	45.90	
	MGLi	0.240	2.88	15.9	0.360	0.117	24	2.892	0.614										
	MG	0.221	3.14	38.5	0.237	0.163	20	4.020	1.659										
	BMGliY	0.653	1.12	3.2		0.136	15	1.790	12.555		96	0.513	3.770	5.117	4.675	70	0.018	38.09	
IDS92	YPG	0.351	1.98	89.5	0.177	0.205	18	3.591	10.121	BMMY	24	1.253	4.076	4.782	8.654	83	0.013	55.45	
	YPGli	0.243	2.86	12.0	1.045	0.197	24	4.457	10.465		120	0.330	6.502	7.363	9.756	61	0.011	66.01	
	MGLi	0.162	4.27	16.2	0.360	0.092	24	2.310	0.687										
	MG	0.221	3.14	65.2	0.208	0.187	22	4.229	0.643										
	BMGliY					0.127	15	2.087			120	1.623	4.453	3.744	10.858	62	0.026	26.36	
IDS94	YPG	0.353	1.96	85.3	0.221	0.225	18	4.096	11.729	BMMY	96	1.693	4.758	5.051	7.755	78	0.007	99.02	
	YPGli	0.329	2.10	11.7	0.727	0.198	24	4.544	15.586		96	0.190	7.417	7.417	8.091	62	0.011	66.01	
	MGLi	0.233	2.97	15.0	0.360	0.130	24	3.209	0.800										
	MG	0.210	3.30	68.0	0.216	0.194	22	4.382	0.557										
	BMGliY					0.150	15	2.087			24	1.203	4.362	4.997	10.577	68	0.019	35.91	

continúa

continuación

Cepas	Fase de Crecimiento										Fase de Inducción							
	Medio	$\mu_{(x)}$	td	CVCS	$Y_{(x/s)}$	$P_{(x)}$	TCS	PSTCS	PETCS		T. Máx. Act.	Act. IDS	PE	UP	PSfinal	CVCM	$\mu_{(x)}$	td
		(h ⁻¹)	(h)	(%)	(g/g)	(g/l h)	(h)	(g/l)	(mg/ml)	Medio	(h)	nmol h ⁻¹ mg ⁻¹	(mg/ml)	ml ⁻¹ min ⁻¹	(g/l)	(%)	(h ⁻¹)	(h)
		TCS																Global
IDS144	YPG	0.345	2.01	92.5	0.183	0.199	18	3.582	11.639	BMMY	120	1.573	3.240	4.866	7.692	101	0.016	43.32
	YPGli	0.321	2.16	11.9	0.736	0.267	24	4.620	10.907		48	4.350	4.014	5.013	7.798	63	0.040	17.55
	MGLi	0.184	3.77	14.5	0.360	0.099	24	2.462	1.190									
	MG	0.229	3.03	56.4	0.243	0.182	24	4.491	0.786									
	BMGliY					0.125	15	1.923			72	0.903	3.010	4.758	6.871	60	0.034	20.57
IDS149	YPG	0.364	1.90	72.3	0.172	0.181	18	3.240	10.810	BMMY	24	1.093	3.355	4.873	6.801	87	0.023	30.27
	YPGli	0.396	1.75	15.1	0.621	0.204	24	4.438	14.836		24	4.070	3.209	4.698	2.674	55	0.024	29.00
	MGLi	0.164	4.23	8.3		0.091	24	2.275	0.939									
	MG	0.237	2.93	43.2	0.334	0.192	24	3.987	0.978									
	BMGliY					0.127	15	2.158			24	0.058	3.775	4.836	5.159	56	0.035	19.80
IDS153	YPG	0.355	1.95	87.9	0.291	0.283	18	4.948	11.003	BMMY	120	0.643	4.573	6.859	8.607	77	0.024	28.64
	YPGli	0.314	2.21	15.8	0.910	0.289	24	6.358	16.740		48	4.150	3.002	5.527	7.739	78	0.006	126.03
	MGLi	0.143	4.86	10.3	0.360	0.093	24	2.333	0.933									
	MG	0.227	3.05	67.9	0.194	0.174	22	3.944	0.866									
	BMGliY					0.125	15	1.919			24	0.643	4.367	4.927	5.628	57	0.020	35.55
<i>P. pastoris</i>	YPG	0.321	2.16	84.0	0.154	0.168	20	2.713	11.104	BMMY			11.435	4.862	5.183	79	0.014	50.23
	YPGli	0.458	1.51	4.9		0.241	24	5.413	12.931				18.744	5.83	10.272	70	0.006	113.63
	MGLi+Hist	0.224	3.09	15.1	0.360	0.101	24	2.525	1.205		D							
	MG+Hist	0.113	6.13	23.0	0.102	0.044	24	1.164	1.595									
	BMGliY					0.164	15	2.216					10.317	6.997	6.379	-	0.014	50.97

continúa

Cepas	Fase de Crecimiento										Fase de Inducción							
	Medio	$\mu_{(x)}$	td	CVCS	$Y_{(x/s)}$	$P_{(x)}$	TCS	PSTCS	PETCS		T.Máx. Act.	Act. IDS	PE	UP	PSfinal	CVCM	$\mu_{(x)}$	td
		(h ⁻¹)	(h)	(%)	(g/g)	(g/l h)	(h)	(g/l)	(mg/ml)	Medio	(h)	nmol h ⁻¹ mg ⁻¹	(mg/ml)	ml ⁻¹ min ⁻¹	(g/l)	(%)	Global	(h ⁻¹)
<i>P. pastoris (neg)</i>	YPG	0.210	3.30	94.7	0.143	0.202	16	2.835	12.841	BMMY		8.584	5.652	3.459	-	0.009	75.34	
	YPGli	0.287	2.42	11.5	1.140	0.276	24	6.932	8.669			13.997	3.913	9.674	71	0.006	121.60	
	MGLi	0.253	2.74	11.4	0.360	0.214	24	5.234	1.183		NA							
	MG	0.270	2.56	92.8	0.163	0.225	14	3.476	1.916									
	BMGLiY						0.159	15	4.323				13.082	3.263	7.536	59	0.008	87.
											Alb (mg/ml)							
<i>P. pastoris (Alb)</i>	YPG	0.496	1.40	61.3	0.261	0.267	20	5.335	14.303	BMMY	120	0.603	25.365	5.747	11.777	-	0.010	68.63
	YPGli	0.384	1.81	12.2	1.654	0.266	24	8.646	12.042		120	0.354	9.561	4.593	11.304	72	0.007	103.45
	MGLi	0.275	2.53	9.7		0.172	24	4.221	0.586									
	MG	0.232	2.99	40.0	0.202	0.112	24	2.689	0.967									
	BMGLiY					0.151	15	2.165			120	0.720	7.357	3.952	5.933	61	0.004	182.41

$\mu_{(x)}$: velocidad específica de crecimiento. **td**: tiempo de duplicación. **CVCS**: coeficiente de variación del consumo de sustrato. $Y_{(x/s)}$: rendimiento biomasa/sustrato según tiempo de consumo del sustrato. $P_{(x)}$: productividad de biomasa. **TCS**: tiempo de consumo del sustrato. **PS TCS**: peso seco según tiempo de consumo del sustrato. **PE TCS**: proteínas extracelulares según tiempo de consumo del sustrato. **T. Máx. Act.**: tiempo en que se logra la máxima actividad IDS. **Act. IDS**: actividad IDS. **PE**: proteínas extracelulares al tiempo de máxima actividad IDS. **UP**: unidades proteolíticas al tiempo de máxima actividad IDS. **PSfinal**: peso seco final. **CVCM**: coeficiente de variación del consumo de metanol. **NA**: no aplica la determinación. **D**: datos asumidos como interferencia y descontados en las demás determinaciones.

TABLA 3. Condiciones experimentales durante el transcurso de los cultivos en reactor de 3L (M6- M9 y M13)

Condiciones Experimentales	Cultivos en Reactor de 3L				
	M6	M7	M8	M9	M13
Porcentaje de oxígeno disuelto (%OD) Máxima	82.4	102.1	85	92.3	91.5
Porcentaje de oxígeno disuelto (%OD) Mínima	21.2	39.8	2	9.7	27.5
pH	5.90	5.86	6.06	6.04	5.96
T (°F)	85.6	85.7	85.7	85.6	85.5
Densidad celular (X máxima) (g/l)	11.49	17.88	22.13 (83h)	26.03 (120h)	12.99
Densidad celular (X al inicio de la inducción) (g/l)	7.01 (20h)	12.08 (26h)	18.29 (28h)	25.53 (108h)	11.25
Velocidad específica (m) crecimiento (1/h)	0.15	0.18	0.21	0.21	0.18
Velocidad específica (m) inducción (1/h)	0.0056	0.0031	0.0035	-0.0031	0.0031
Tiempo de agotamiento del Glicerol (h)	18	26	60	128	24
Tiempo de inducción con metanol (h)	74	81	79	48	71
Factor rendimiento $Y_{(x/s)}$ crecimiento	0.51	0.47	0.35	0.33	0.63
Factor rendimiento $Y_{(x/s)}$ inducción	0.14	0.14	0.26	-0.21	0.017
Proteínas extracelulares máxima (g/l) crecimiento	0.17 (16 h)	0.16 (24 h)	0.23 (0 h)	0.29 (18 h)	0.12 (4h)
Proteínas extracelulares Promedo (g/l) crecimiento	0.12	0.13	0.16	0.19	0.05
Proteínas extracelulares Máxima (g/l) inducción	0.38 (57 h)	0.44 (26 h)	0.13 (47 h)	0.29 (120 h)	0.14(58.5h)
Proteínas extracelulares Promedo (g/l) inducción	0.28	0.17	0.11	0.16	0.12
Actividad proteolítica máxima (UP/ml min) inducción	0.175 (57h)	0.185 (95 h)	0.216 (83h)	0.421(132h)	0.21 (95h)
Productividad máxima (U*1000/ h)	444.94 (33 h)	628.36 (47 h)	154.96 (47 h)	0	725.71(35h)
Rendimiento máximo (U/g Metanol)	3.12 (33 h)	1.81 (47 h)	3.24 (47 h)	0	9.54 (35h)
Actividad IDS-hr máxima (nmol/mg h)	15.25 (94 h)	29.36 (47 h)	7.50 (71 h)	0	25.4 (35h)

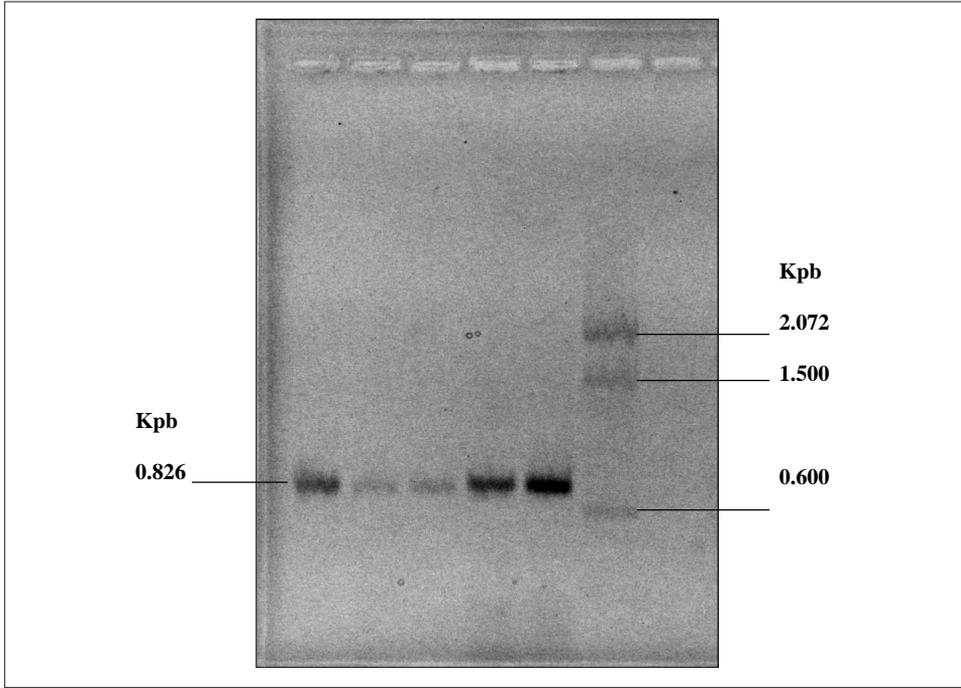


FIGURA 1. Fotografía negativa de la electroforesis en gel de agarosa (1% (p/v) en tampón TBE 1X). Análisis de PCR de 5 clones de GS115/pPIC9-hIDS: carril 1: IDS92, carril 2: IDS94, carril 3: IDS144, carril 4: IDS149, carril 5: IDS153, carril 6: 100bp Ladder (Gibco BRL), carril 7: Control Negativo de la PCR.

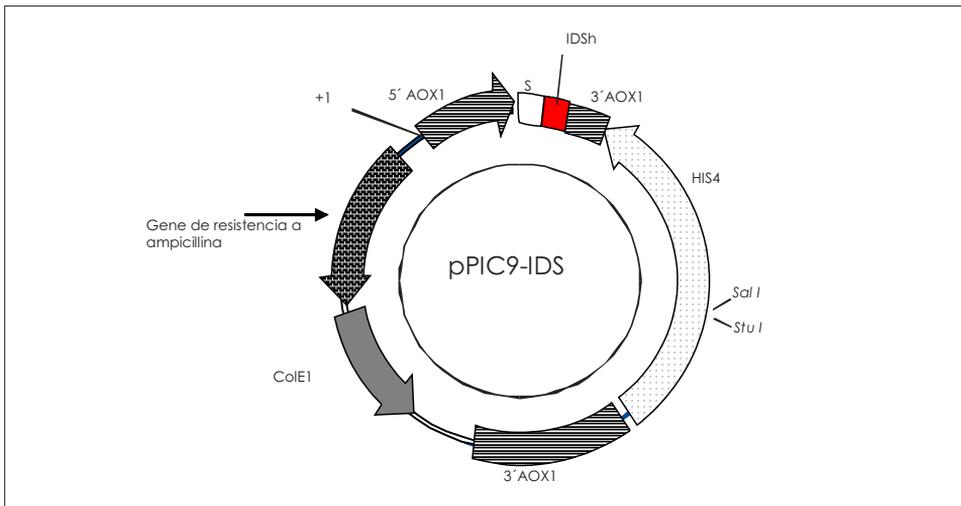


FIGURA 2. Mapa de la construcción genética pPIC9-IDS_h, el fragmento en rojo destaca la inserción del cDNA de Iduronato 2-sulfato sulfatasa humana (IDS_h).

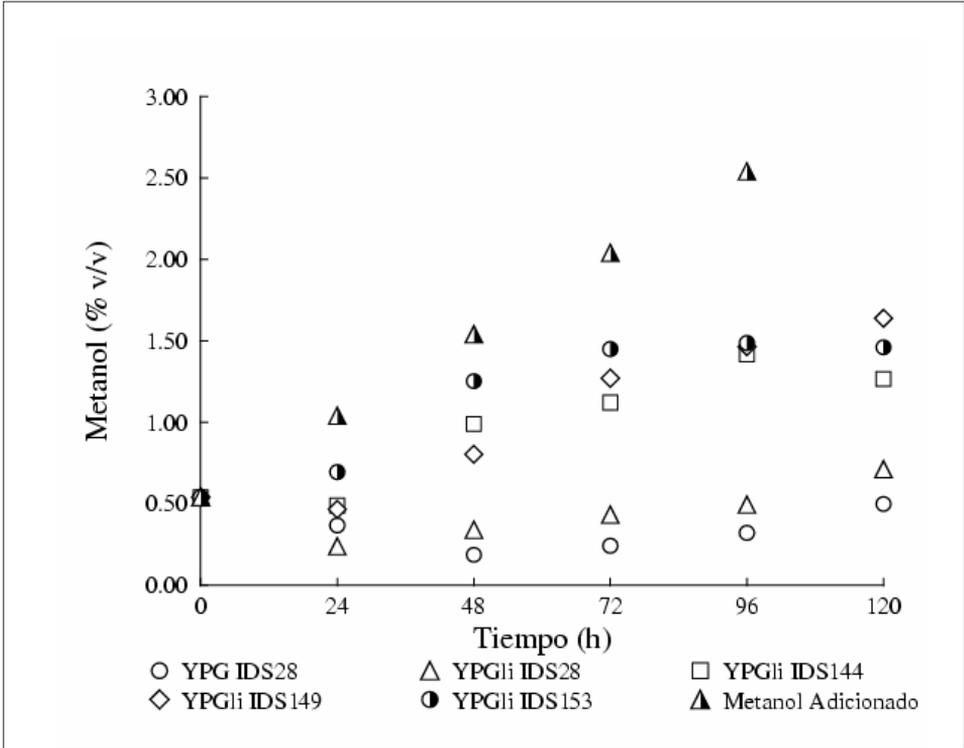


FIGURA 3. Gráfico de Metanol (% v/v) vs., Tiempo (h). Clones IDS28, IDS144, IDS149 e IDS153, en los medios YPG y YPGli empleados para la fase de crecimiento. Se observa el metanol añadido al proceso y el metanol residual detectado en cada uno de los experimentos durante la fase de inducción.

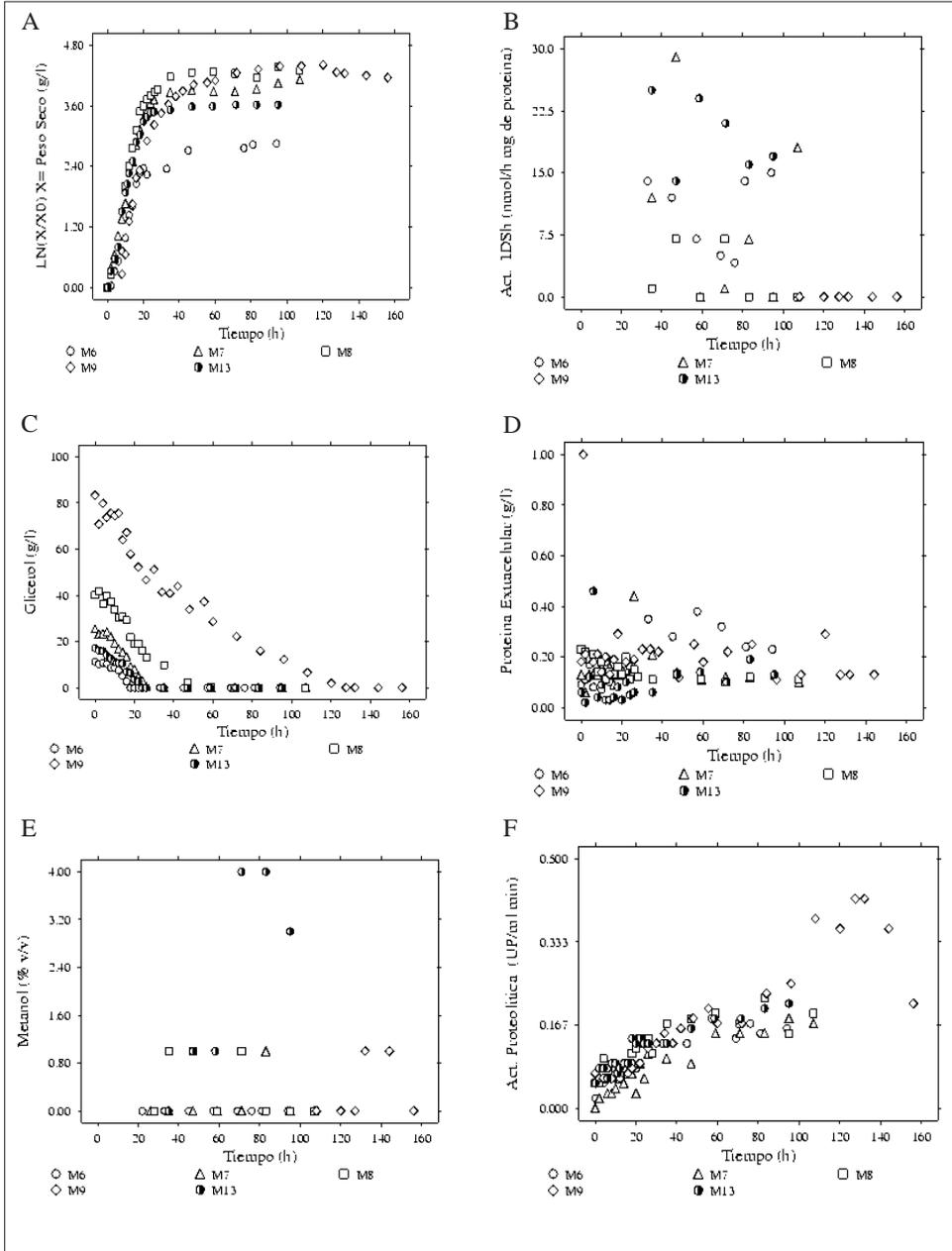


FIGURA 4. Gráficos del comportamiento del clon IDS28 a escala de 11 en medio salino MBS-sF. A: $\ln(X/X_0)$, B: Act IDS_h (nmol/h mg), C: Glicerol (g/l), D: Proteínas extracelulares (g/l), E: Metanol (% v/v), F: Act. Proteolítica (UP/ml min) vs. Tiempo (h).