

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

Campus Monterrey

Escuela de Ingeniería y Ciencias



Mejoramiento de la producción de Royalactina (MRJP1) en *Pichia pastoris*,
mediante generación de una cepa sobreproductora y su cultivo en
biorreactor.

Tesis presentada por

Héctor Manuel Castañeda Aponte

Sometida a la

Escuela de Ingeniería y Ciencias

como un requisito parcial para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

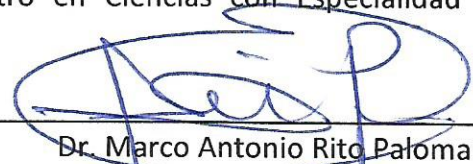
Monterrey Nuevo León, 4 de diciembre de 2017

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

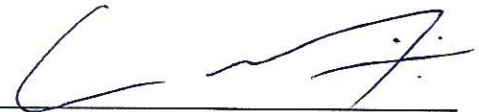
Campus Monterrey

Escuela de Ingeniería y Ciencias

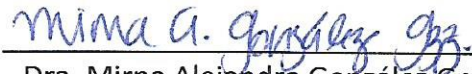
Los miembros del comité aquí citados certificamos que hemos leído la tesis presentada por Héctor Manuel Castañeda Aponte y consideramos que es adecuada en alcance y calidad como un requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Biotecnología,



Dr. Marco Antonio Rito Palomares
Tecnológico de Monterrey
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
Escuela de Ingeniería y Ciencias
Asesor principal



Dr. José Manuel Aguilar Yañez
Tecnológico de Monterrey
Escuela de Ingeniería y Ciencias
Co-asesor



Dra. Mirna Alejandra González González
Tecnológico de Monterrey
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
Co-asesor



Dr. Rubén Morales Menéndez
Director Nacional de Posgrado
Escuela de Ingeniería y Ciencias

Monterrey Nuevo León, 04 de diciembre de 2017



Declaración de autoría

Yo, **Héctor Manuel Castañeda Aponte**, declaro que esta tesis titulada, **Mejoramiento de la producción de Royalactina (MRJP1) en *Pichia pastoris***, mediante generación de una cepa sobreproductora y su cultivo en biorreactor, y el trabajo que se presenta en ella es de mi autoría. Adicionalmente, confirmo que:

- Realice este trabajo en su totalidad durante mi candidatura al grado de Maestro en Ciencias en esta universidad.
- He dado crédito a cualquier parte de esta tesis que haya sido previamente sometida para obtener un grado académico o cualquier otro tipo de titulación en esta o cualquier otra universidad.
- He dado crédito a cualquier trabajo previamente publicado que se haya consultado en esta tesis.
- He citado el trabajo consultado de otros autores, y la fuente de donde los obtuve.
- He dado crédito a todas las fuentes de ayuda utilizadas.
- He dado crédito a las contribuciones de mis coautores, cuando los resultados corresponden a un trabajo colaborativo.
- Esta tesis es enteramente mía, con excepción de las citas indicadas.



Héctor Manuel Castañeda Aponte

Monterrey Nuevo León, 4 de diciembre de 2017

@2017 por Héctor Manuel Castañeda Aponte

Todos los derechos reservados

Dedicatoria

A Yoru por estar a mi lado.

A mi familia siempre al tanto de mí.

A mis profesores por sus consejos y paciencia.

A mis amigos lejanos y cercanos.

Reconocimientos

- Al grupo de enfoque de Bioprocesos y Biología Sintética por recibirme dentro de su grupo y haberme apoyado con el desarrollo de este proyecto.
- Al centro de Biotecnología y a sus trabajadores por el soporte y apoyo prestado durante mis estudios de maestría.
- Al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey por la oportunidad de permitirme cursar mis estudios de posgrado mediante la beca de condonación de la colegiatura.
- Al CONACYC por el apoyo financiero mediante el número de beca: 703956

Mejoramiento de la producción de Royalactina (MRJP1) en *Pichia pastoris*, mediante generación de una cepa sobreproductora y su cultivo en biorreactor.

por

Héctor Manuel Castañeda Aponte

Resumen

La proteína MRJP1 (del inglés Major Royal Jelly Protein 1) mejor conocida como Royalactina (RY) tiene potencial para su explotación en la industria farmacéutica, utilizado como agente hepático-protector, factor estimulante de eritropoyesis, adyuvante para reducir los niveles de colesterol en sangre.

En trabajos anteriores se han propuesto diferentes modelos para la expresión de MRJP1, sin embargo, ninguno ha sido idóneo para la producción a escala piloto debido a títulos y rendimientos bajos. El presente trabajo tiene como objetivo aumentar la expresión de la proteína RY en *Pichia pastoris*, incrementando el número de copias del gen *ry*, mejorando las condiciones del cultivo en la fase de producción y cultivo en fed-batch en biorreactor.

Resultados. Se realizó la construcción de dos diferentes plásmidos para la expresión de RY, uno bajo el control del promotor pAOX1 (inducible con metanol) y un segundo con una versión mejorada del promotor pPPGAP (inducible con glucosa). Los plásmidos se transformaron de forma independiente a una comercial de *P. pastoris*. Se realizó el fenómeno de hiperresistencia para aumentar el número de copias de RY integradas al genoma de *Pichia*, al final del proceso se obtuvieron 119 candidatas productoras.

Todas las candidatas fueron evaluadas mediante cinéticas realizadas en microplaca. Al final del proceso se obtuvieron 14 cepas sobreproductoras (10 bajo el promotor pAOX1 y 4 con el promotor pPPGAP. Estas cepas productoras se evaluaron en matraces en medio complejo. De las cepas evaluadas se encontró que la cepa **G3-5** (portando el promotor pPPGAP) presentaba el mejor rendimiento de producción de RY, cerca de 0.5 g L^{-1}

Posteriormente se llevaron a cabo estudios de mejoramiento de condiciones de cultivo, donde se evaluaron tres medios diferentes y dos temperaturas diferentes para la fase de expresión (25 y 30°C). Los resultados muestran que se alcanzan rendimientos superiores en medio mineral y 25 °C con un título final de 1.2 g L^{-1} .

Conclusiones. Se ha generado y caracterizado una cepa de *P. pastoris* cuyo título y rendimiento son los más altos reportados para la producción recombinante de Royalactina. Dados los parámetros cinticos y de producción de la cepa es una candidata adecuada para futuros trabajos de escalamiento y optimización del bioproceso.

Índice de Figuras.

Figura 1. Mapas de los plásmidos contruidos para este trabajo	16
Figura 2. Región nativa NTS en el genoma de Pichia pastoris	17
Figura 3. Estrategia general seguida.	22
Figura 6. Comprobación de la integración del vector de expresión pPIC5.....	27
Figura 7. Imágenes del SDS-PAGE de las cinéticas en microplaca de todas las candidatas de la librería.	30
Figura 8. Análisis de densitometría de las 119 candidatas evaluadas.....	31
Figura 9. A) Cinéticas de crecimiento de cepas representativas.....	33
Figura 11. Evaluación de cepas sobreproductoras	38
Figura 12. Optimización del medio de cultivo y temperatura.....	41
Figura 13. Resultados de los experimentos de las cinéticas en biorreactor.....	46

Lista de Tablas

Tabla 1. Lista de plásmidos usados en este trabajo, y sus principales características.	15
Tabla 2. Lista, secuencia y función de los primers usados para este trabajo.	15
Tabla 3. Selección de candidatas vía inserción NTS.	26
Tabla 4. Lista de cepas que comprende la librería de candidatas.	28
Tabla 5. Tabla comparativa de resultados de cultivos en biorreactor	47
Tabla A. 1 Abreviaciones.....	50
Tabla A. 2 Acrónimos	516
Tabla A. 3 Variables y símbolos.....	47

Contenido

Resumen	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tablas	vii
1. Introducción.....	1
1.1. La Royalactina y su potencial farmacéutico.....	1
1.2. Planteamiento del problema y su contexto.....	2
1.3. Preguntas planteadas.....	3
1.4. Visión general de la solución.....	4
2. Marco Teórico.....	6
3. Hipótesis	12
4. Objetivo general	12
4.1. Objetivos específicos.....	12
5. Metodología	13
5.2. Transformación de <i>Pichia pastoris</i>	18
5.3. Selección de cepas y cultivos de <i>Pichia</i>	19
5.4. Cultivos en biorreactor.....	19
5.5. Métodos analíticos.....	20

5.6. Estrategia general del proceso.....	21
6. Resultados	24
6.1. Transformación y selección de candidatas.	24
6.2. Selección de las cepas sobreproductoras.	27
6.3. Evaluación de las cepas NTS.....	34
6.4. Evaluación de altas productoras de RY.	37
6.5. Mejoramiento de las condiciones de cultivo.	40
6.6. Cultivos en biorreactor.....	42
7. Conclusiones.....	48
8. Recomendaciones.....	49
Apéndice A	50
Abreviaciones y Acrónimos	50
Apéndice B	52
Variables y Símbolos	52
9. Bibliografía	53

1. Introducción

1.1. La Royalactina y su potencial farmacéutico.

La jalea real (RJ) es una secreción blanco -amarillenta, producida de las glándulas hipofaringeales y salivares de las abejas jóvenes (Cornara *et al.* 2017). La RJ es el sustento nutricional para todas las larvas de abejas, desde el nacimiento hasta el tercer día de vida; aquellas larvas que han sido seleccionadas para convertirse en reinas son alimentadas con RJ hasta los cincuenta días de su vida como larva. esta dieta tiene un impacto significativo en el tiempo de vida y en el tamaño de las abejas reina (Fratini *et al.* 2016).

La jalea real posee numerosas funciones y ha sido ampliamente usada en productos medico comerciales, alimentos saludables y cosmético (Viuda-Martos *et al.* 2008; Cornara *et al.* 2017). El uso de la RJ como un producto funcional y potenciador de la salud ha sido investigados desde principios de los 60's. Hoy en día la jalea real es consumida a nivel mundial como un suplemento alimenticio o en formulaciones cosméticas y farmacéuticas (Fujita *et al.* 2013).

La jalea real es una mezcla compleja de azúcares, proteínas, lípidos y vitaminas (Shen *et al.* 2015). Dentro de las proteínas más abundantes de la RJ se encuentra la proteína MRJP1, conocida como Royalactina (RY), esta glicoproteína de 57 kDa forma parte de un gran complejo oligomérico de proteínas, llamadas MRJPs (Buttstedt *et al.* 2014; Nozaki *et al.* 2012).

En 2011, Kamakura reportó que una sola proteína en la jalea real, la Royalactina (MRJP1 o RY), es la que actúa como el efector clave en "switch genético" que desencadena el desarrollo el dimorfismo fenotípico en las abejas, vía el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr). Es decir, la Royalactina es el efector clave que desencadena el desarrollo morfológico de las abejas, convirtiendo a algunas en abejas reina y en otras en obreras; esto ocurre supuestamente a nivel epigenético mediante la estimulación del EGFr (Kucharski *et al.* 2015).

En 2015 Detienne *et al.* reportaron que la suplementación al medio con Royalactina extiende el tiempo de vida, el tamaño y la fecundidad de *Caenorhabditis elegans* a través de la señalización

del EGFr. Xin *et al.*, (2016) reportó un efecto similar en *Drosophila melanogaster*, y el efecto es evidente hasta tres generaciones después de haber agregado le RY.

Otros estudios han señalado que la suplementación de esta proteína en los cultivos estimula el crecimiento de los hepatocitos de rata y previene su apoptosis (Kamakura *et al.* 2001).

La RY también muestra efectos antibacteriales, antihipertensivos y actúa como un factor de crecimiento en células de mamífero (Mandacaru *et al.* 2017).

En suma, varios trabajos apuntan a que la proteína RY podría tener un nicho de oportunidad en la industria farmacéutica, utilizado como agente hepático-protector, factor estimulante de eritropoyesis y como adyuvante para reducir los niveles de colesterol en sangre (Mannoor *et al.* 2009; Kohno *et al.* 2004; Simúth 2001; Tokunaga *et al.* 2004; Chen *et al.* 2016).

1.2. Planteamiento del problema y su contexto.

La disponibilidad y la purificación del RY a partir de jalea real es complicado. De 25-35 gr RY/ Kg de RJ (Fratini *et al.* 2016; Buttstedt *et al.* 2014). Por lo que la explotación esta proteína es un área de oportunidad para la biotecnología, mediante su expresión en forma recombinante.

En trabajos anteriores se han propuesto diferentes modelos para la expresión de MRJP1. Júdová J. *et al.*, (1998) reporta la expresión de la proteína MRJP1 en *Escherichia coli*, sin embargo, sus resultados no son alentadores, presenta títulos muy bajos de 0.1 a 0.2 g L⁻¹ y además se generan cuerpos de inclusión, donde la proteína se encuentra mal plegada, por lo que no conserva gran parte de su actividad biológica (Júdová J, Klaudiny J 1998).

También se ha reportado la producción de MRJP1 en células de tabaco, sin embargo, los títulos son bajos y las líneas celulares producen diferentes versiones glicosiladas de la proteína,

generalmente versiones ricas en manosa. Este patrón de glicosilación difiere mucho de las que normalmente se presentan en células de insecto, por lo que la actividad biológica de la proteína disminuye, haciendo de este modelo un candidato poco adecuado para la expresión de esta proteína (Júdová *et al.* 2004).

She *et al.*, (2010) fue el primero en reportar en *Pichia pastoris*, la expresión de MJPR1, gen construido a partir de cDNA AccMJPR1 de *Apis cerana*. En este trabajo se comprueba la actividad biológica de la proteína recombinante en líneas celulares de insecto, promoviendo la proliferación celular *in vivo*. Sin embargo, los títulos finales de recuperación reportados son más bien bajos: 0.11 gr/L de proteína recombinantes bajo la expresión del promotor AOX en el vector pPIC9K, y purificados en una columna de afinidad His-tag (Shen *et al.* 2010; Shen *et al.* 2015).

Ibarra C. *et al.*, (2014) presenta un modelo similar al de Shen *et al.*, (2010) con el gen de MRJP1 de *Apis mellifera* clonado en *Pichia pastoris* bajo en promotor AOX en el vector pPICZ α -B y bajo un proceso de bioseparación de ATPS (Aqueous Two-Phase Systems). Resultando en un título de producción de 0.24 g L⁻¹ y una eficiencia de recuperación del 83.5% (Ibarra-Herrera *et al.* 2014).

1.3. Preguntas planteadas

En 2015 Torres-Acosta *et al.*, usando los datos reportados por Ibarra C *et al.*, (2014) reporta un análisis económico de un modelo escalado teórico de la producción de RY en *Pichia pastoris*, evaluando título de producción, recuperación del proceso y costo de materiales. Donde se encontró que el título es el factor más relevante a fin de optimizar el proceso (Torres-Acosta *et al.* 2015). Mediante la generación de múltiples copias del cassette de expresión bajo un promotor fuerte, se estimó que es posible alcanzar 5 g L⁻¹ de RY.

Mediante el aumento de copias del gen de interés, ry, bajo un promotor fuerte, ¿será posible alcanzar un título suficientemente alto como para hacer que la producción de RY en *Pichia pastoris* sea un bioproceso costeable?

¿Cuáles son las condiciones de cultivo adecuadas para la expresión de RY en *Pichia pastoris*?, usando cualquiera de los dos promotores más conocidos en *Pichia*, pAOX1 y pGAP.

1.4. Visión general de la solución.

Para lograr generar una cepa que produzca cantidades considerables de proteína recombinante por lo general se cumple la regla de que a altos número de copias del cassette de expresión, será mayor la expresión del gen y, por ende, la cantidad de la proteína recombinante. En caso de *Pichia* esto ocurre incitando la replicación del cassette de expresión de forma postraduccional, mediante el método *PTVA*, (PosTrasformational Vector Amplification) reportado por Sunga *et al.* (2008), el cual es el punto de partida en este trabajo. Además, e forma alternativa se explora un método alternativo, la inserción en regiones *NTS* (NonTranscribed intergenic Spacer), el cual promete ser igual de efectivo. (Marx *et al.* 2009).

Este trabajo parte con la generación de 4 plásmidos de expresión con diferentes características, dos promotores diferentes y dos métodos de inserción. Se genera una librería de candidatas expresantes de la proteína RY usando los dos métodos de inserción diferentes.

Esta librería es evaluada de forma intensiva para encontrar las candidatas con mejor crecimiento y con los rendimientos más altos de producción. Tras varias rondas de selección, se deberá encontrar una cepa que reúna las mejores cualidades para su cultivo a mayor escala.

Una vez encontradas las condiciones de cultivo óptimas (inoculo, medio de cultivo, pH, temperatura, tiempo de inducción e inductor) para la expresión de la proteína RY en matraz; se

cultiva en biorreactor de 3 L a fin de encontrar las condiciones necesarias para alcanzar la meta de producción de 5.5 g L^{-1} de proteína recombinante

2. Marco Teórico.

Está claro que para llevar la producción de RY a escala industrial se necesita incrementar el número de copias del cassette de expresión, los parámetros de cultivo y de purificación, a fin de tener un bioproceso costeable y altamente eficiente

La levadura *Pichia pastoris* es uno de los organismos modelos más utilizados para la expresión y producción de proteínas heterólogas (Puxbaum *et al.* 2015). Este microorganismo posee cualidades únicas que lo hacen un huésped adecuado para los procesos biotecnológicos de biosíntesis:

- I. Pocos requerimientos nutrimentales, puede crecer en medios de cultivo baratos ya sean complejos o sintéticos, como el YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose) o medio mínimo mineral, a velocidades razonables de 0.1 a 0.3 h⁻¹ (Looser *et al.* 2014).
- II. Se cuenta con herramientas moleculares eficientes y bien caracterizadas (molecular toolbox). Plásmidos estándar, promotores fuertes y bien caracterizados: pAOX1 y pPPGAP, sistema CRISPR-Cas9 validado, proceso PTVA para generación de inserciones en tándem (Mecklenbräuker *et al.* 2011; Ahmad *et al.* 2014).
- III. Kits comerciales: cepas, plásmidos y medios de cultivo, vendidos por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- IV. *Pichia* posee la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales de forma muy eficiente, produciendo proteínas recombinantes biosimilares a las nativas (Puxbaum *et al.* 2015). Hoy en día se comercializan cepas humanizadas, cuyo patrón de glicosilación es similar al realizado por células humanas, permitiendo la expresión de proteínas con fines terapéuticos (Damasceno *et al.* 2012; Kim *et al.* 2015).

- V. Es capaz de crecer hasta densidades celulares altas, aproximadamente 150 gr de peso seco/L (Looser *et al.* 2014).

Una de las primeras cuestiones a atender cuando se quiere producir alguna proteína en *Pichia* es la elección de un promotor adecuado, ya que el control de la expresión génica juega un papel importante en la producción de proteínas en cantidades suficientes. El promotor AOX históricamente ha sido el más utilizado por su fuerza de expresión y su control, el cual es inducido bajo la presencia de metanol en el medio de cultivo (Liu *et al.* 2016; Huang *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2000). Sin embargo, en varios trabajos se reporta que la adición de metanol resulta en un estrés oxidativo para la célula, llegando a ser un inconveniente, en algunos casos resulta en un bajo título de proteína recombinante (Vogl & Glieder 2013). Por esta razón se ha buscado promotores opcionales, explotando el pool genético natural de *Pichia* o mediante la generación de librerías de promotores mutantes (Stadlmayr *et al.* 2010; Mecklenbräuker *et al.* 2011; Ahmad *et al.* 2014; Vogl *et al.* 2013). La alternativa más común es el uso del promotor pGAP, considerado por muchos autores como un promotor constitutivo, mientras que otros autores indican que su expresión varía considerablemente dependiendo de la fuente de carbono presente en el medio de cultivo; algo razonable considerando que regula la producción de una enzima que participa en el metabolismo central (Xiulin Qin *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2009; Mao *et al.* 2015).

No existe a la fecha un forma precisa para determinar cuál promotor se debe usar en cada caso, y lo recomendable es generar varias versiones del gen de interés bajo el control de diferentes promotores, transformar, realizar un screening exhaustivo y determinar que opción es la más adecuada específicamente para el caso particular (Aw & Polizzi 2013).

Otro inconveniente es el proceso de generación de cepas sobreproductoras, el método más utilizado hasta la fecha es el proceso *PTVA* (Aw & Polizzi 2016; Sunga *et al.* 2008), basado

en repeticiones en tándem del plásmido entero en el mismo locus. Este resulta ser un proceso tedioso, costoso y que implica un análisis exhaustivo de un número considerable de candidatas para encontrar la cepa ganadora, la cual, en condiciones ideales, producirá un título alto de proteína en un tiempo razonable, ya que el proceso genera muchas cepas con errores en integración del cassette de expresión (Aw & Polizzi 2013).

Una posible solución a este inconveniente es la inserción en un solo evento en múltiples *loci* esparcidos a lo largo del genoma (Ran et al. 2016; Marx et al. 2009) Es decir, la integración se lleva acabo vía recombinación de una secuencia conservada y repetida en múltiples sitios. Esto significa que se puede obtener una cepa con múltiples copias del cassette de expresión en un solo evento de recombinación/transformación. Esta estrategia ya ha sido reportada anteriormente para el caso de proteínas modelo como la Cu/Zn superóxido dismutasa humana (hSOD) y la albumina de suero humana (HSA) (Marx et al. 2009), sin embargo, no se han reportado su aplicación a otros casos de estudio.

Una vez obtenida la cepa sobreproductora el siguiente tema a atacar es el modo de operación en que la cepa debe de ser cultivada para asegurar un bioproceso altamente productivo, sin causar demasiado estrés a la célula y cuya purificación sea fácil (Jahic et al. 2006). Dependiendo del promotor elegido es el modo de operación a utilizar, se ha comprobado que el modo fedbatch es favorable para las cepas que expresan bajo el promotor AOX1, debido a la toxicidad del metanol la adición de este a dosis discretas resulta en altos rendimientos (Vogl & Glieder 2013; Spohner et al. 2015). Para el promotor pGAP se observa que la producción de proteína está acoplada al crecimiento celular, por lo que estrategias de cultivo continuo resultan ser más eficaces (Müller et al. 2016). Aún quedan otros modos de operación por explorar como los sistemas de perfusión, los cuales pueden ayudar a bajar los costos de producción y aumentar los rendimientos.

P. pastoris es considerada un huésped deseable para la expresión de enzimas y proteínas de diferentes fuentes. Por lo general altos niveles de expresión de proteínas recombinantes son alcanzados en biorreactor. A diferencia de cultivos en matraz, en biorreactor los parámetros del cultivo como pH, aireación y tasa de alimentación de fuente de carbono pueden ser controlados con precisión y en tiempo real (Cereghino & Cregg 1999), ello permite una mayor reproducibilidad en los cultivos y el hecho de que *Pichia Pastoris* tiene la capacidad de alcanzar altas densidades celulares ($>500 \text{ OD}_{600\text{n}} \text{ mL}^{-1}$ o $>100 \text{ g L}^{-1}$ de peso seco) bajo las condiciones de cultivos son las adecuadas (Looser *et al.* 2014; Vogl *et al.* 2013).

Para realizar el salto de cultivo de baja densidad celular en matraz a altas densidades en biorreactor es necesario la optimización de las condiciones de cultivo: pH, temperatura y concentración de inóculo (Cereghino *et al.* 2002). Sin embargo, las condiciones establecidas en fermentador en pequeña escala normalmente necesitan ser ajustadas durante el escalamiento a grandes volúmenes, como la tasa de alimentación de fuente de carbono (en caso de operación en modo fedbatch), tasa de dilución (en caso de operación en modo continuo) y la tasa de aireación (Higgins & Cregg 1998).

En general, dos estrategias de cultivo para *Pichia pastoris* son derivadas de los promotores más usados: el promotor inducible a metanol, pAOX1 y el promotor constitutivo pGAP, que normalmente funciona bajo fuentes de carbono ricas, glicerol, glucosa, sorbitol, etc. (Higgins & Cregg 1998).

En el caso de la utilización del promotor pAOX1 es necesario un proceso de cultivo en biorreactor en tres etapas (Higgins & Cregg 1998). La primera es el crecimiento o acumulación de biomasa usando un medio definido con una fuente de carbono no fermentable como el glicerol, que es la opción más usual. La segunda etapa es la fase de transición al cultivo fedbatch, donde se alimenta al cultivo con glicerol a una tasa limitada

a la velocidad de crecimiento, con el objetivo de incrementar la concentración de biomasa y de preparar a las células para la inducción (Liu *et al.* 2016). La tercera etapa, la fase de inducción consiste en la alimentación con metanol, iniciando una tasa baja para facilitar la aclimatación de la célula al metanol, seguido con tasas incrementales de metanol hasta alcanzar la tasa de crecimiento deseable (Looser *et al.* 2014; Cereghino & Cregg 1999; Vogl & Glieder 2013).

Ya que el cultivo en biorreactor con metanol requiere equipos, espacios y protocolos de manejo especiales, debido a la inflamabilidad del metanol, resulta ser un proceso relativamente caro a gran escala. Por ello en los últimos años ha ganado la aceptación el sistema de expresión con el promotor pGAP. Para el cultivo a escala biorreactor el sistema continuo ofrece rendimientos más elevados de proteína recombinante en menos tiempo que el método fedbatch con metanol (Rebnegger *et al.* 2014; Maurer *et al.* 2006).

Se ha observado que la producción de proteínas bajo el promotor pGAP está correlacionado positivamente a la velocidad de crecimiento. Con glicerol o glucosa, *Pp* alcanza velocidades de crecimiento significativamente más grandes, entres 1.7 y 8.5 veces, que con metanol. Durante el crecimiento en modo batch con glucosa, la μ_{max} varia de 0.28 a 0.16 h⁻¹ (Sauer *et al.* 2004).

La relación entre la productividad específica q_p (mg_{producto} · g⁻¹ peso seco de biomasa · h⁻¹) y μ (h⁻¹) refleja el equilibrio entre varios procesos dentro de la célula y la secreción del producto. Esta relación, llamada cinética de producción es esencial para el diseño racional de estrategias de cultivo en que el óptimo crecimiento se mantiene mediante la adición de la fuente de carbono en modo fedbatch (Cereghino & Cregg 1999; Maurer *et al.* 2006).

La concentración final más alta de biomasa reportada para una cepa de *P. pastoris* crecida en metanol, cultivada en modo fedbatch, fue de 1,500 gr L⁻¹ (Cereghino *et al.* 2002), mientras que el crecimiento en glucosa se alcanzó una biomasa superior a los 200 gramos de peso seco por litro (Heyland *et al.* 2011).

Generalmente, altas productividades y altos títulos son alcanzados si el cultivo ocurre en altas concentraciones de biomasa, por largos periodos, en la μ deseada para la formación de producto, antes de que se alcance los límites del sistema, por ejemplo, máxima concentración de biomasa, máxima evolución de calor o suministro de oxígeno (Heyland *et al.* 2011).

En sistemas controlados por el promotor pAOX1 normalmente alcanzan productividades específicas a bajas tasas de crecimiento. En cambio, en los sistemas de expresión controlados por pGAP tienden a exhibir altas tasas de formación específica de producto en niveles comparables a las cepas AOX1, pero en μ operacionales cerca de la μ_{\max} .

3. Hipótesis.

Si se incrementa el número de copias del gen RY, a través del método PTVA o por inserciones en la región NTS, es posible generar y caracterizar una cepa de *Pichia pastoris* sobreproductora de proteína RY cuyo título y rendimientos sean superiores a los reportados anteriormente.

4. Objetivo general.

Generar y caracterizar una clona de *Pichia pastoris* sobreproductora de la proteína RY con un título aproximado a 5 g L⁻¹ a nivel biorreactor.

4.1. Objetivos específicos.

- Construir diferentes vectores de expresión (usando dos promotores diferentes: pAOX1 y pGAP) para transformarlos en *Pichia pastoris*. Se obtendrá una cantidad de candidatas de *Pichia* que expresen el gen ry en diferentes concentraciones, con la cual se armará una librería.
- Armar y evaluar la librería de candidatas que expresen diferentes versiones de los promotores de expresión. De la evaluación se elegirá una candidata sobreproductora.
- Caracterizar la cepa sobreproductora y mejorar las condiciones de cultivo: pH, temperatura y medio de cultivo, a fin de aumentar la producción de la RY.
- Realizar cultivos en Fedbatch en biorreactor a diferentes niveles de Oxígeno disuelto (O_d) para caracterizar la producción de la RY.

5. Metodología

5.1. Cepas y plásmidos

La cepa de *E. coli* DH5 α TM (Invitrogen/Life Technologies., Carlsbad, CA, EUA) fue usada como chasis standard para la manipulación genética y clonación de los vectores trabajados. Fue cultivada de forma rutinaria en caja Petri y/o matraz usando el medio de Luria Bertoni (low salt) suplementado con 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de zeocina, a 37 °C y 250 rpm en caso de cultivo líquido.

Tres cepas de *Pichia pastoris* fueron usadas en este trabajo:

- 1) Cepa silvestre **X-33** adquirida a Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA)
- 2) Cepa deficiente en proteasa, construida en el laboratorio, nombrada como **MG4**, la cual procede de la **cepa 4** (*ade2*, *prb1*, *pep4*) del kit de PichiaPinkTM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), la cual le fue restaurado el genotipo *ade2* mediante la integración del vector vacío pPINK α -HC en el locus *trp2*.
- 3) Cepa productora **CI4**, la cual ha sido reportada previamente por Ibarra-Herrera *et al.* 2014, ya existente en el laboratorio.

Estas cepas fueron usadas como huéspedes para expresar el gen MRJP1, en diferentes plásmidos y diferentes estrategias de integración.

La secuencia del promotor PPGAP fue tomada del Qin *et al.*, (2011) y fue sintetizado químicamente por DNA2.0 (Menlo Park, CA, EUA) con el péptido señal alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reactivos de PCR, los kits para extracción de plásmidos y purificación de fragmentos de DNA fueron comprados de Promega (Madison, WI, EUA).

En la **Tabla 1** se enlistan los plásmidos usados y construidos para este trabajo, en **Figura 1** se muestran los usados para expresa RY y sus principales características. En breve, el gen ry fue tomado del plásmido pPINK α -ry reportado por Ibarra-Herrera C. *et al.*, (2014) el gen fue cortado con las enzimas XhoI/XbaI. El fragmento de 1,200 pares de bases (pbs) fue insertado en el plásmido pPICZ-1 para crear el pPIC2. Posteriormente el promotor AOX1 fue intercambiado por el pGAP mediante el corte con BglII y XhoI para crear el plásmido pPIC3.

Para la construcción del plásmido pPIC5 fue necesaria la clonación de la región NTS1 (aprox. 1,500 pbs) usando los primers Fw_Nts_Bgl y Rv_Nts_Xb. Para el plásmido pPIC4 se clonó la región NTS2 (aprox. 1,200 pbs) utilizando los primers Fw_Nts_Bgl y Rv_Nts_Bm., **Tabla 2**, **Figura 2**. Los productos de NTS1 y 2 fueron purificados y digeridos con BglI/XbaI y BglI/BamHI, respectivamente, antes de la ligación con el vector.

Tabla 1. Lista de plásmidos usados en este trabajo, y sus principales características.

Plásmido	Esqueleto	Promotor	Gene	Resistencia	Elementos extra
pPINK-Ry	pPINK	Aox1	Ry	Amp ¹	ADE2
pPIC1	pPICZ-alfa-B	pAOX1	X4	Zeo ²	
pPIC2	pPICZ-alfa-B	pAOX1	Ry	Zeo	
pPUC-pPGAP-bsd	pPUC57	pGAP		Amp	-
pPIC3	pPICZ-alfa-B	pGAP	Ry	Zeo	
PIC4	pPICZ-alfa-B	pAOX1	Ry	Zeo	rDNA
PIC5	pPICZ-alfa-B	pGAP	Ry	Zeo	rDNA

1. Ampicilina.
2. Zeocina.

Tabla 2. Lista, secuencia y función de los primers usados para este trabajo.

Nombre	Función	Secuencia
<i>Fw_Nts_Bgl</i>	Clonación	CGTGagatctGACAAGTATCCGC
<i>Rv_Nts_Bm</i>	Clonación	TACGCGTGGAtCCGTGTACTA
<i>Rv_Nts_Xb</i>	Clonación	CCTTCAtCTaGACCTCACCTTGACTC
<i>Fw_alfa2</i>	Confirmación	GCTGCTCCAGTCAACACTACAA
<i>Rv_aox</i>	Confirmación	GCAAATGGCATTCTGACATCC

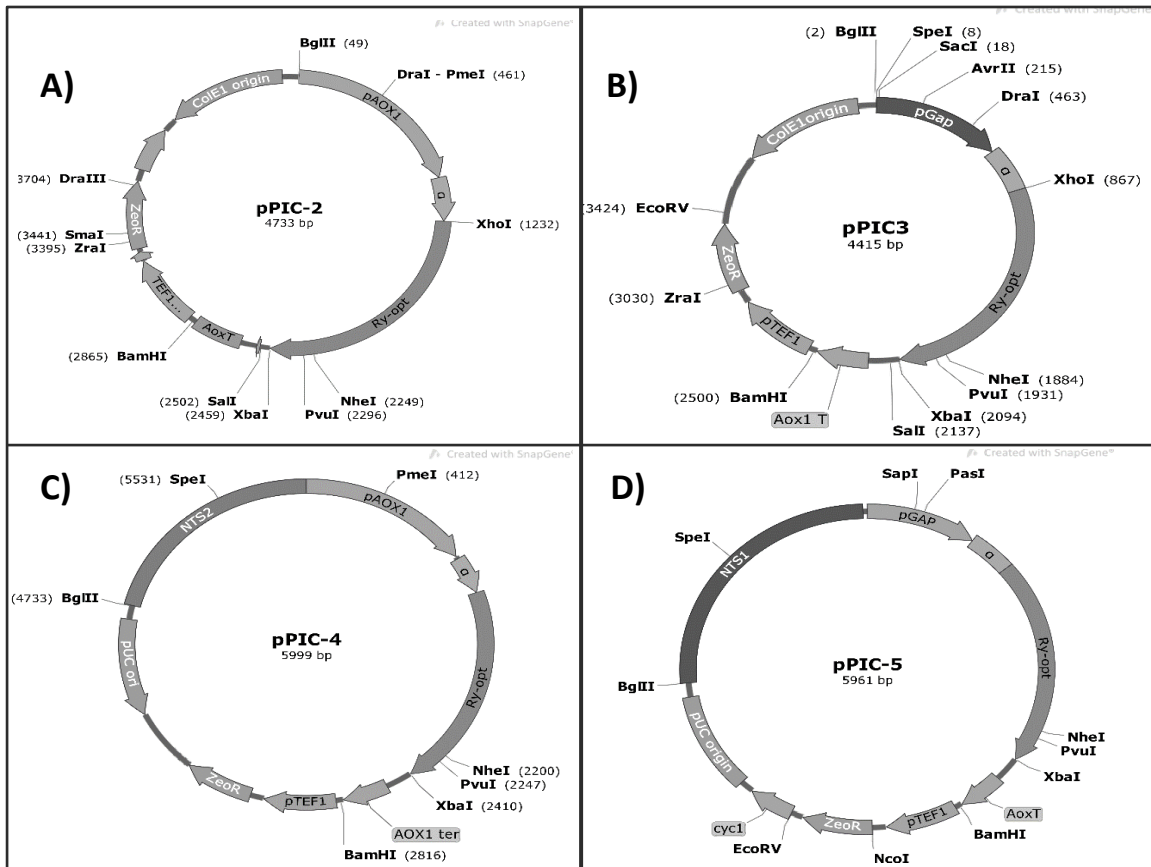


Figura 1. Mapas de los plásmidos construidos para este trabajo. Los elementos y sitios de restricción relevantes son mostrados. A) pPIC2, B) pPIC3, C) pPIC4 y D) pPIC5.

E. coli fue cultivada de forma rutinaria a 37°C en cajas Petri o en matraces en medio LB (low salt) suplementado con 25 µg mL⁻¹ Zeocina o 100 µg mL⁻¹ Ampicilina cuando fuese necesario.

Las cepas de *P. pastoris* fueron cultivadas de forma rutinaria en medio YPD liquido o agar a 30°C y 250 rpm para cultivos líquidos. Los medios RDB (Regeneration Dextrose Medium) y PAD (Pichia Adenine Dropout) fueron usados para recuperar las células después de la electroporación. El medio RDB fue preparado acorde a lo reportado por Wu S. *et al.* (2004), en breve, 1M de Sorbitol, 1% (p/v) de dextrosa, 0.00004% (p/v) biotina, 1.34% (p/v) YNB, y

2% (p/v) agar. El medio PAD fue comprado a Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

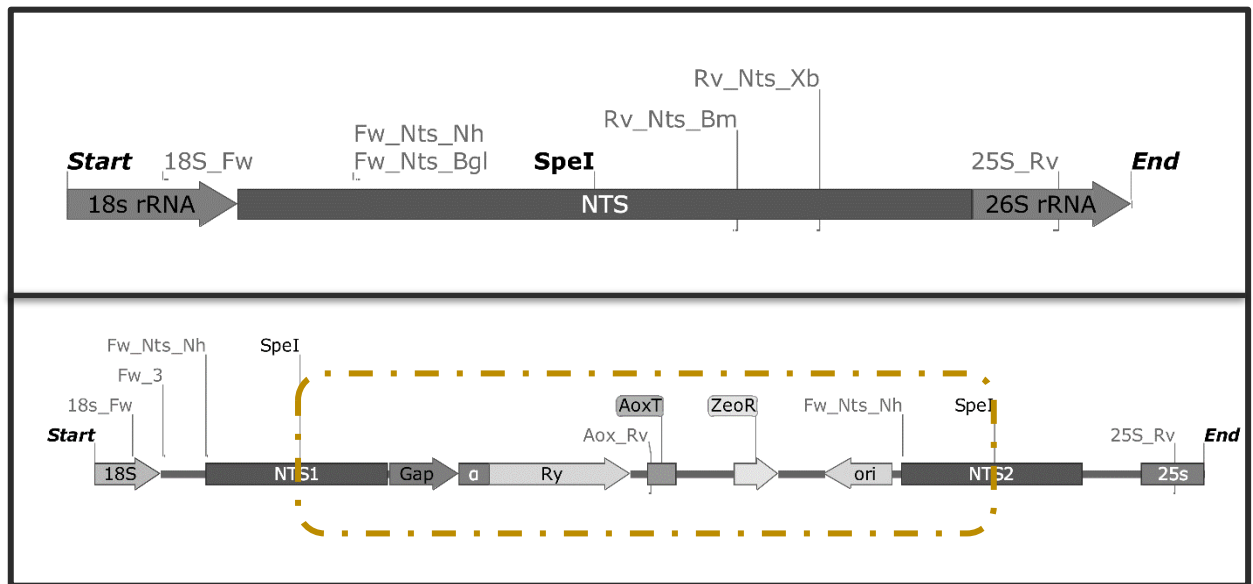


Figura 2. A) Región nativa NTS en el genoma de *Pichia pastoris*. Se muestran los primers usados para amplificar el fragmento. B) Representación esquemática de la inserción del plásmido pPIC5 dentro de la región genómica NTS *Pichia*. Los primers usados para confirmar inserción son mostrados

Los cultivos de selección en microplato y matraz fueron realizados en medio BMGY/ BMMY (buffered complex glycerol or methanol medium) suplementado con 100 a 2,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de zeocina, el medio fue preparado acorde las instrucciones del manual *PichiaPink™* Expression System (Invitrogen/Life Technologies; Carlsbad, CA, EUA). En cinéticas de matraz la inducción fue realizada mediante la adición de glucosa al 2% (p/v) a las candidatas portados del promotor pGAP, mientras que metanol al 0.5% (p/v) fue adicionado a las candidatas portando el promotor pAOX1.

El medio mínimo mineral (M3) fue preparado acorde los reportado por Gholsalkar A., *et al.* (2008), con ligeras modificaciones para los experimentos en matraz. La formulación final quedo de la siguiente forma: 20 g L⁻¹ glicerol, 7.5 g L⁻¹ sulfato de amonio, 8.7 g L⁻¹ sulfato de magnesio heptahidratado, 100 mM buffer fosfato pH 7.1, 1.5 mL L⁻¹ solución de vitaminas y 10 mL L⁻¹ solución de elementos traza. La composición de las vitaminas fue D-biotina 0.05 g L⁻¹, D-pantotenato de calcio 1.00 g L⁻¹, ácido nicotínico 1.00 g L⁻¹, mio-inositol 25.0 g L⁻¹, tiamina hidroclicóric 1.00 g L⁻¹, piridoxol hidroclicóric 1.00 g L⁻¹ y ácido p-amino benzoico 0.20 g L⁻¹. La solución de elementos traza contiene EDTA 3 g L⁻¹, sulfato de Zinc heptahidrato 0.9 g L⁻¹, cloruro manganeso dihidrato 155 mg L⁻¹, cloruro de cobalto (II) dihidrato 60 mg L⁻¹, sulfato de cobre (II) pentahidrato 60 mg L⁻¹, molibdato disódico dihidrato 80 mg L⁻¹, cloruro calcio dihidrate 0.9 g L⁻¹, sulfato de fierro heptahidrato 0.6 g L⁻¹, ácido bórico 200 mg L⁻¹, y ioduro de potasio 20 mg L⁻¹.

Las enzimas de restricción fueron adquiridas a New England Biolabs (Ipswich, MT, EUA). Reactivos y estándares de proteína para electroforesis fueron adquiridos de BioRad (Hercules, CA, EUA). Los reactivos antes listados fueron comprados a BD o a Sigma, a menos que se indique lo contrario.

5.2. Transformación de *Pichia pastoris*.

Células electrocompetentes fueron preparadas acorde al protocolo de LiAc/DTT reportado por Wu & Letchworth (2004), con ligeras variaciones: las células se cosecharon en 2.0 OD (600 nm), la concentración final de células electrocompetentes se ajustó aproximadamente a 5 X10⁹ células/80µl, debido a que la mezcla se vuelve demasiado viscosa para manejarla apropiadamente, por último, se linealizaron de 3 a 6 µg de plásmido por reacción.

5.3. Selección de cepas y cultivos de *Pichia*.

Para la selección de candidatas se realizaron cultivos en microplatos de 96 pozos acorde a X. Qin *et al.* (2011). Una colonia de cada candidata fue picada con un palillo e inoculada en un pozo de una placa de 96 pozos Costar/corning (New York, NY. EUA) con 100 μ L de medio de cultivo BMGY. Tras 24 h de crecimiento a 30°C y 250 rpm, la densidad óptica fue tomada antes de centrifugar el plato a 3,000 g's por 10 min. El sobrenadante fue removido completamente y se añadió 100 μ L de medio BMGY o BMMY dependiendo la candidata. Se cultiva por otras 24 h y al final el sobrenadante se toma para determinar la concentración de proteína recombinante secretada por ensayo colorimétrico y por SDS-PAGE.

Los cultivos en matraz fueron hechos en 25 y 50 mL con matraces de 100 y 250 mL, respectivamente con medio BMGY para la fase de crecimiento. BMGY (se añade glucosa en vez de glicerol) para las candidatas que portan el promotor pGAP, y BMMY para las candidatas que portan el promotor pAOX1, para la fase de expresión. El cambio de medio (inducción) fue realizado cuando el cultivo alcanzó de 6 a 10 OD's.

5.4. Cultivos en biorreactor.

Se utilizaron dos reactores de 3 L de la marca Applikon (Delft, Holanda), con volúmenes de operación de 2 L, usando medio MG original. Se añadió al medio 40 g L⁻¹ de glicerol como única fuente de carbono.

El suministro de oxígeno inicial se realiza con aire a 1 VVM/min y comienza en condiciones de saturación, la agitación se programa en loop dependiente del oxígeno disuelto en los rangos de 400 a 600 rpm. La temperatura se ajusta a 30°C \pm 2°C y el pH a 6.5 \pm 3. El setpoint de oxígeno se ajusta en rango de 30 a 100%.

Se realizaron al menos dos replicas independientes de cada condición probada. En los resultados se reportan medias y la desviación estándar de cada condición.

Se utiliza la adicción de hidróxido de sodio 3 N como agente regulador de pH. Antiespumante GA10, PureProcess/Entegris (Billerica, MT, EUA), al 25% como agente regulador del nivel a fin de evitar la formación excesiva de espuma. Los cuales se preparan en módulos independientes y se adicionan según las necesidades del cultivo.

El cultivo se inicia con un inóculo ajustado a 0.1 OD's. El pre-inóculo se inicia 36 h antes con un vial de 30 μ L de células criopreservadas en glicerol inoculadas en un matraz con 50 mL de medio YPD. Tras 24 h de crecimiento a 30°C y 250 rpm el cultivo se transfiere a un matraz de 1 L y se agrega medio YPG hasta alcanzar 100 mL. 12 h después el pre-inóculo debe de tener entre 10 y 12 OD's, suficientes para comenzar el cultivo en biorreactor.

Una cantidad ajustada de inóculo se agrega al reactor, mezclado con la cantidad necesaria de la solución de elementos traza (20 mL L⁻¹, 50X) y vitaminas (1.5 mL L⁻¹) ya sea por inyección directa a una septa o mediante el módulo de inoculación.

5.5. Métodos analíticos.

La determinación de la concentración de proteína fue realizada mediante métodos colorimétricos. La proteína producida en medio como YPD, BMGY y BMMY fue determinada por el método de Bradford, Biorad (Hercules, CA, USA) en microplato. 30 μ L de muestra son mezclados con 250 μ L del reactivo de Bradford, se deja incubando por 5 min a temperatura ambiente y se registra la absorbancia a 595 y 450 nm en un lector de microplatos (BioTek, Winooski, VT, USA). Para el medio mineral MG se siguió el método de BCA, Pierce (Waltham, MT, USA), 25 μ L de muestra son mezclados con 250 mL de Working reagent, la reacción se

incuba por 30 min a 37°C, se deja enfriar por 1 min a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 562 nm. La curva estándar de BSA (Bovine Serum Albumine) se realiza en el rango de 20 a 2,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las muestras se leen por duplicado y se promedian.

5.6. Estrategia general del proceso.

El primer objetivo de este trabajo es desarrollar una cepa productora de RY bajo estrategias moleculares y de cultivo diferentes a las comúnmente utilizadas. En la **Figura 3** se muestra el proceso general seguido en este trabajo, comparando los dos métodos de generación de cepas multicopia.

Una de las cuestiones más importantes que se plantearon en el trabajo fue acerca de cuál es el promotor apropiado para expresar RY. Para ello se construyeron en paralelo dos versiones del vector, uno bajo el promotor Aox1 (pPIC2) y otro bajo pPPGAP1 (pPIC3). Se realizó la construcción de dos diferentes plásmidos para la expresión de RY, uno bajo el control del promotor pAOX1 (inducible con metanol) y un segundo con una versión mejorada del promotor pPPGAP (inducible con glucosa) (Vogl & Glieder 2013). Los plásmidos se transformaron de forma independiente a una cepa comercial de *P. pastoris*. Se realizó el procedimiento de PTVA para aumentar el número de copias de RY integradas al genoma de *Pichia*, por inserciones en tándem en el mismo *loci*.



Figura 3. Estrategia general seguida.

De forma paralela tomando los vectores pPIC2 y 3 se insertó la región NTS1 en cada vector, generando los vectores pPIC5 (pGAP- α -RY- NTS) y pPIC4 (pAOX1- α -RY-NTS). Al final de la etapa molecular se obtuvieron 4 plásmidos, listados en la **Tabla 1**.

El objetivo de tener un segundo set de vectores portando la región NTS1 es probar si este procedimiento de inserción en múltiples regiones genómicas (múltiples locus) puede arrojar cepas sobreproductoras evitando el proceso PTVA, lo que se traduciría en menos tiempo generando una librería de candidatas y por ende un proceso de screening menor.

Esto nos arroja dos procesos en paralelo, la generación de candidatas por PTVA, su transformación, la generación de hiperresistencia por re-estriado en medio YPD con concentraciones incrementales de antibiótico. Por otro lado, la transformación y generación de un menor número de candidatas por inserción en regiones NTS.

Para la selección de cepas sobreproductoras varios autores han propuesto la selección basado en el número de copias vía qPCR con posterior análisis en cinéticas en matraz de las cepas con mayor número de copia, sin embargo esta estrategia no siempre arroja buenos resultados, ya que generalmente no existe una relación lineal entre número de copias con el título de proteína recombinante, por lo tanto es necesario análisis exhaustivos en matraz, lo que implica mucho tiempo consumido en esta actividad. Lo que nosotros proponemos es el análisis de la librería completa generada por el proceso PTVA en cinéticas llevadas a cabo en microplacas. Lo que nos arrojará un borrador de las candidatas con mayores títulos de proteína recombinante independientemente del número de copias. Que después se confirma por qPCR.

En paralelo se tiene la inserción de los plásmidos pPIC5 y 4, sobre cepas Wild Type (WT), la selección inicial se realiza a altas concentraciones de Zeocina ($1,000 \mu\text{g ml}^{-1}$), tras restringido y confirmación de la inserción vía PCR, se avalúan a un número reducido de candidatas en matraz.

6. Resultados y Discusión

6.1. Transformación y selección de candidatas.

La cepa CI4 fue transformada con los plásmidos pPIC2 y pPIC3 de forma independiente, las células transformada fueron plaqueadas en medio RBD con $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ zeocina, se eligieron 45 candidatas las cuales fueron re-estriadas en medio YPD con $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de zeocina, tras tres días de crecimiento solo crecieron 23 candidatas portando el plásmido pPIC2 y 8 candidatas portando el plásmido pPIC3, **Figura 4**. El resto de candidatas se consideran falsas positivas, un fenómeno ya reportado anteriormente por otros autores, las diferencias en el número de verdaderas positivas en ambas construcciones se debe probablemente a que el sitio de escisión para linearizar/transformar el plásmido fue diferente, de igual forma ya se había reportado diferencias similares en trabajos anteriores (Aw & Polizzi 2013; Potvin *et al.* 2012b; Looser *et al.* 2014; Liu *et al.* 2016; Melicherová *et al.* 2016; Mao *et al.* 2015).

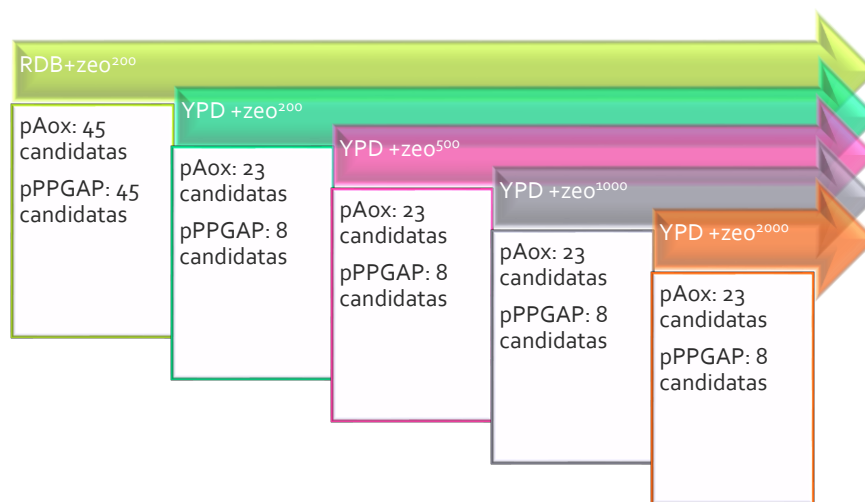


Figura 4. Proceso PTVA y generación de candidatas en cada pase de concentración de antibiótico.

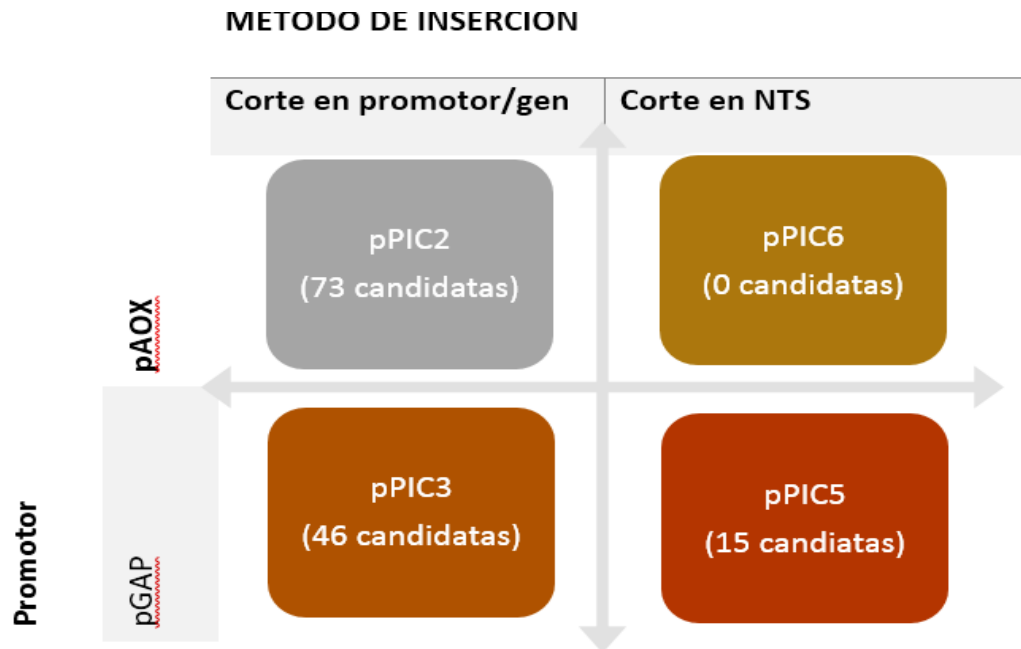


Figura 5. Matriz de relación de los 4 plásmidos construidos. Entre paréntesis se muestran el número de candidatas obtenidas al transformar.

Al final del proceso PTVA se obtuvieron: 73 candidatas portando inserciones pAOX1-ry, y 46 candidatas portando inserciones pGAP-ry. De esta forma se generó una librería de 119 candidatas expresantes de la proteína RY (**Figura 5**). Las cepas fueron nombradas de forma sistemática acorde al promotor insertado, A (Aox1) o G (PPGAP), la concentración de zeocina usada en la placa de Petri (1 por 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 15 por 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2 por 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 3 por 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y un número de serie. La lista completa de las cepas generadas se presenta en la **Figura 7B**.

De forma paralela se realizó la transformación de los plásmidos pPIC4 y pPIC5 en las cepas X-33 y MG4 (cepa 4) en medio PAD. En ambas cepas evaluadas para el plásmido pPIC5 se obtuvieron más de 100 colonias, mientras que para el plásmido pPIC4 no se obtuvieron

ninguna colonia en la placa de transformación. Para las candidatas seleccionadas con este método se utilizó una clave para su nomenclatura, mostrada en la **Tabla 3**. X ó 4, por la cepa usada como huésped, 4 ó 5 por el vector de expresión y P por el medio de selección, PAD, usado para rescatar a las células después de la transformación con el plásmido. En suma, se seleccionaron 14 candidatas, únicamente portando el vector pPIC5 insertado, 7 candidatas de X5P y 7 de 45P se seleccionaron, se re-estriaron, se extrajo DNA genómico y realizó PCR para confirmar la inserción del gen pPIC5, **Figura 6**.

En este paso ya se pueden observar las diferencias que implica cada método de inserción, PTVA vs NTS, ya que en el primero se requirió realizar pases en concentraciones incrementales de zeocina para generar el fenómeno de hiper resistencia, generando que en cada pase aumente el número de candidatas de la librería, ya que al final del proceso es necesario evaluar a todas (Aw & Polizzi 2013). En cambio, el proceso NTS al empezar el plaqueo pos-transformación en una concentración elevada de zeocina, 1,000, garantiza que las colonias que crecen a esa concentración ya poseen varios números de copias tanto del cassette de expresión como del gen de resistencia a zeocina, para poder sobrevivir a esas concentraciones elevadas del antibiótico. Por lo tanto, no es necesario el proceso PTVA, y por ende la generación y evaluación de un número elevado de candidatas.

Tabla 3. Selección de candidatas vía inserción NTS.

Cepa	Plásmido	Clave	# transformantes	# Candidatas	Seleccionadas
X-33	pPic-5 (NTS-pGAP-RY)	X5P	>200	7	3
	pPic-4 (NTS- pAOX1-RY)	X6P	91	0	0
MG-4	pPic-5 (NTS-pGAP-RY)	45P	87	7	2
	pPic-4 (NTS- pAOX1-RY)	46P	52	0	0

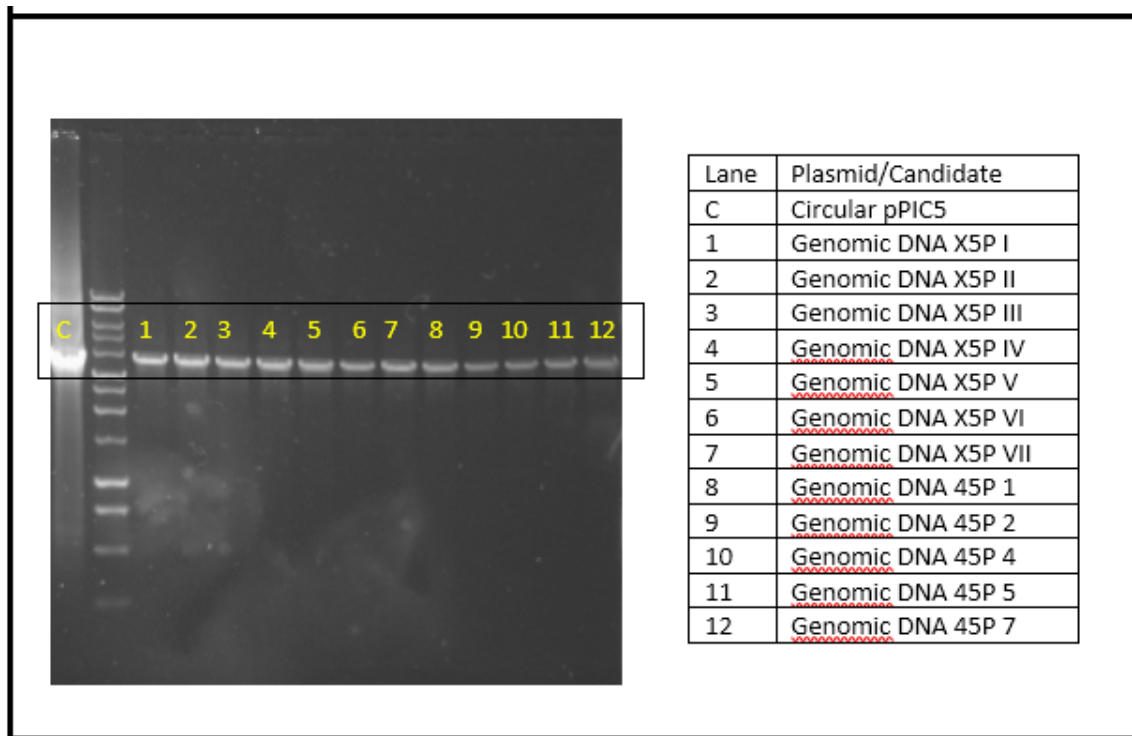


Figura 6. Comprobación de la integración del vector de expresión en el genoma de las candidatas por PCR. Escalera de peso molecular 1Kb Promega®. Los primers usados generan una banda de 3,800 pbs, como control positivo se utilizó el pPIC5 circular.

6.2. Selección de las cepas sobreproductoras.

Todas las candidatas fueron evaluadas en cinéticas realizadas en microplacas (**Figura 7**). Se evaluó la producción de proteína tras 24 horas de producción. Se tomó el sobrenadante y se analizó el contenido de proteína secretada cargándolos en geles SDS-PAGE y mediante análisis de densitometría se evaluó el contenido de proteína respecto a la cepa control (**CI4**). Los resultados de densitometría (**Figura 8**) se reportaron como intensidad de la banda respecto al control. Partiendo de esto se eligieron las cepas con una mayor producción en cada nivel de concentración de zeocina.

Al final del proceso se obtuvieron 14 cepas sobreproductoras (10 bajo con el promotor pAOX1 y 4 con el promotor pPPGAP.

Tabla 4. Lista de cepas que comprende la librería de candidatas, serial, nombre asignado y la concentración de Zeocina donde fue generada la candidata respectiva.

Serial	Candidatas PIC2 ("given name")	Numero de candidata y concentración de zeocina	Serial Cepa	Descripción
1	A1-1	C2 Zeo 200	PC	Cepa control
2	A1-2	C3 Zeo 200		
3	A1-3	C4 Zeo 200		
4	A1-4	C7 Zeo 200	PGZ	Cepa parental
5	A1-5	C8 Zeo 200	Serial	Candidatas pPIC3 "given name"
6	A1-6	C9 Zeo 200	A	G1-1 C7 Zeo 200
7	A1-7	C13 Zeo 200	B	G1-2 C9 Zeo 200
8	A1-8	C14 Zeo 200	C	G1-3 C15 Zeo 200
9	A1-9	C16 Zeo 200	D	G1-4 C7' Zeo 200
10	A1-10	C17 Zeo 200	F	G1-5 C9' Zeo 200
11	A1-11	C20 Zeo 200	G	G1-6 C26 Zeo 200
12	A1-12	C22 Zeo 200	H	G1-7 C29 Zeo 200
13	A1-13	C26 Zeo 200	I	G1-8 C45 Zeo 200
14	A1-14	C28 Zeo 200	J	G15-1 C7 Zeo 500
15	A1-15	C29 Zeo 200	K	G15-2 C9 Zeo 500
16	A1-16	C30 Zeo 200	L	G15-3 C15 Zeo 500
17	A1-17	C35 Zeo 200	M	G15-4 C7' Zeo 500
18	A1-18	C36 Zeo 200	N	G15-5 C9' Zeo 500
19	A1-19	C38 Zeo 200	Ñ	G15-6 C26 Zeo 500
20	A1-20	C40 Zeo 200	O	G15-7 C29 Zeo 500
21	A1-21	C42 Zeo 200	P	G15-8 C45 Zeo 500
22	A1-22	C44 Zeo 200	Q	G2-1 C7 Zeo 1,000
23	A1-23	C45 Zeo 200	R	G2-2 C9 Zeo 1,000
24	A15-1	C2 Zeo 500	S	G2-3 C15 Zeo 1,000
25	A15-2	C3 Zeo 500	T	G2-4 C7' Zeo 1,000
26	A15-3	C4 Zeo 500	U	G2-5 C9' Zeo 1,000
27	A15-4	C7 Zeo 500	V	G2-6 C26 Zeo 1,000
28	A15-5	C8 Zeo 500	W	G2-7 C29 Zeo 1,000
29	A15-6	C9 Zeo 500	X	G2-8 C45 Zeo 1,000
30	A15-7	C13 Zeo 500	Y	G3-1 C9 Zeo 2,000
31	A15-8	C14 Zeo 500	Z	G3-2 C7' Zeo 2,000

32	A15-9	C16 Zeo 500
33	A15-10	C17 Zeo 500
34	A15-11	C20 Zeo 500
35	A15-12	C22 Zeo 500
36	A15-13	C26 Zeo 500
37	A15-14	C28 Zeo 500
38	A15-15	C29 Zeo 500
39	A15-16	C30 Zeo 500
40	A15-17	C35 Zeo 500
41	A15-18	C36 Zeo 500
42	A15-19	C38 Zeo 500
43	A15-20	C40 Zeo 500
44	A15-21	C42 Zeo 500
45	A15-22	C44 Zeo 500
46	A15-23	C45 Zeo 500
47	A2-1	C2 Zeo 1,000
48	A2-2	C3 Zeo 1,000
49	A2-3	C4 Zeo 1,000
50	A2-4	C7 Zeo 1,000
51	A2-5	C8 Zeo 1,000
52	A2-6	C9 Zeo 1,000
53	A2-7	C13 Zeo 1,000
54	A2-8	C14 Zeo 1,000
55	A2-9	C16 Zeo 1,000
56	A2-10	C17 Zeo 1,000
57	A2-11	C20 Zeo 1,000
58	A2-12	C22 Zeo 1,000
59	A2-13	C26 Zeo 1,000
60	A2-14	C28 Zeo 1,000
61	A2-15	C29 Zeo 1,000
62	A2-16	C30 Zeo 1,000
63	A2-17	C35 Zeo 1,000
64	A2-18	C36 Zeo 1,000
65	A2-19	C38 Zeo 1,000
66	A2-20	C40 Zeo 1,000
67	A2-21	C42 Zeo 1,000
68	A2-22	C44 Zeo 1,000
69	A2-23	C45 Zeo 1,000
70	A3-22	C22 Zeo 2,000
71	A3-40	C40 Zeo 2,000
72	A3-42	C42 Zeo 2,000
73	A3-44	C44 Zeo 2,000

AA	G3-3	C9' Zeo 2,000
AB	G3-4	C26 Zeo 2,000
AC	G3-5	C45 Zeo 2,000

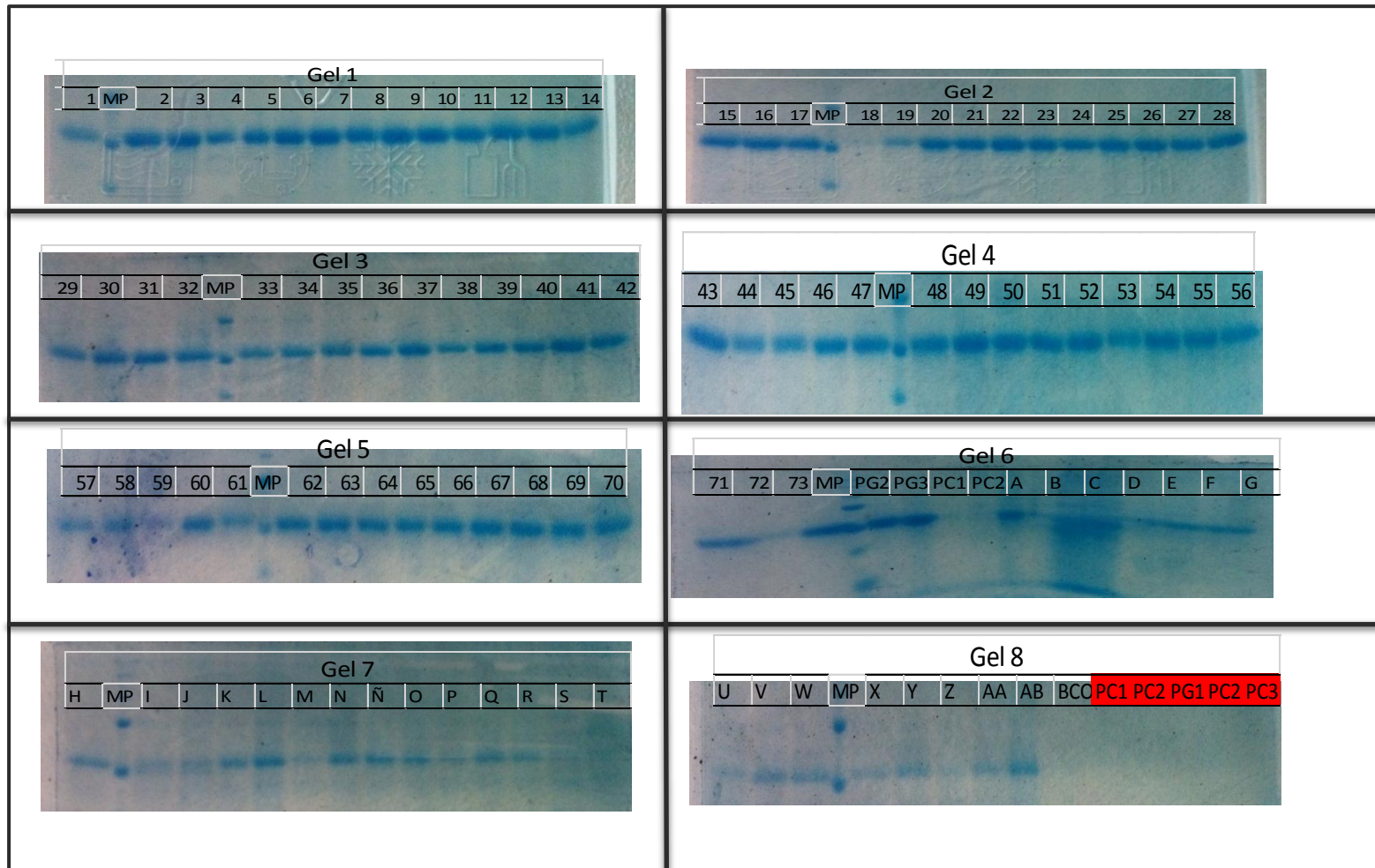


Figura 7. Imágenes del SDS-PAGE de las cinéticas en microplaca de todas las candidatas de la librería, el serial de los carriles corresponde al de la lista de la tabla 4.

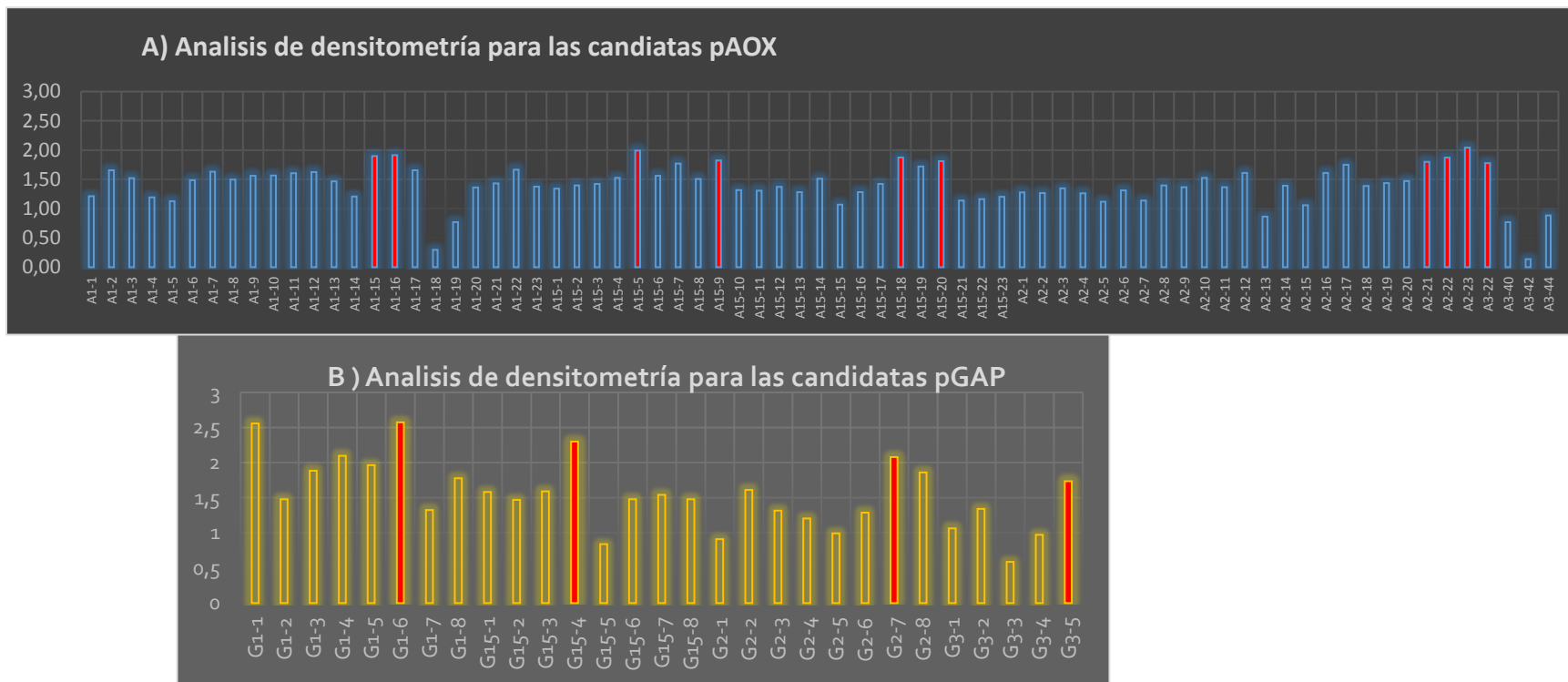


Figura 8. Análisis de densitometría de las 119 candidatas evaluadas en las cinéticas de microplaca. Las barras en rojo indican las candidatas seleccionadas para su evaluación en matraz, A) candidatas pAOX, B)Candidatas pGAP

En el caso particular de este trabajo no se consideró necesario cuantificar el número de copias insertados en el genoma de cada candidata. Debido a que este dato se obtiene mediante qPCR, como lo sugiere (Sunga *et al.* 2008), resulta ser una situación cara e impráctica realizarlo en toda la librería de candidatas y al final un mayor número de copias no es un indicativo de una mayor expresión de interés (Aw & Polizzi 2013; Liu *et al.* 2013). Por lo que se considera que una mejor aproximación dirigida a discriminar las cepas con una producción relevante de las que no, es mediante su cultivo en las condiciones cercanas a un cultivo en forma. Esto se resuelve mediante cultivos en microplaca de toda la librería, lo que permite ahorrar tiempo y recursos (X. Qin *et al.* 2011).

En este caso la cuantificación de los títulos de proteína recombinante mediante el ensayo de Bradford, respaldado por el análisis de densitometría permitió la discriminación de las cepas que mas producen sobre la cepa control CI4. De las cuales 10 candidatas portan el promotor pAOX1 y 14 portan el promotor pGAP.

Las 14 cepas productoras se evaluaron en matraces con medio BMGY, como se observa en la **Figura 9**. Las cinéticas se inician a una OD_{600nm} fija de 0.1, la mayoría de las cepas tienen un perfil de crecimiento similar al mostrado en la **Figura 9A**. La fase de expresión inicia entre las 16 y 18 horas de cultivo, justo en el punto de intersección entre las cepas evaluadas y la cepa parental. Es justo en este punto donde se ha visto que termina la fase exponencial larga y sostenida de las cepas evaluada, con una μ_{max} promedio de 0.3 h^{-1} , en la **Figura 9A** se marca con un circulo este punto de intersección, donde según nuestros resultados es mejor la tasa de producción de las cepas en estudio. Se observa que tras la inducción las cepas inducidas con glucosa crecen a una tasa constante hasta alcanzar cerca de las 30 OD_{600nm} , mientras que las cepas inducidas con metanol prácticamente no crecen más allá de la densidad de inducción.

Los resultados en rendimiento expresado en $\text{g OD}_{600\text{nm}}^{-1}$, **figura 9B**, se pueden observar que para el conjunto de cepas portando el promotor pAOX1, la cepa con el mejor rendimiento es la cepa A15-9, mientras que la cepa G3-5 presenta el mejor rendimiento de las evaluadas para el promotor pGAP.

Para el caso de las candidatas con el vector pPIC5 se puede observar una tendencia que conforme se fue incrementando la concentración de antibiótico durante el fenómeno de hiperresistencia posiblemente también aumentó el número de copias y se refleja en el incremento del rendimiento, proteína vs biomasa, donde el título de proteína incrementa a costa de la generación de biomasa, **figura 9A**. Este fenómeno es lo que debería pasar en el mejor de los casos siguiendo la metodología de PTVA, sin embargo, no en todos los casos ocurre este fenómeno (Aw & Polizzi 2013), por lo que es estrictamente necesario evaluar todas las candidatas de la librería, como ya se ha comentado con anterioridad.

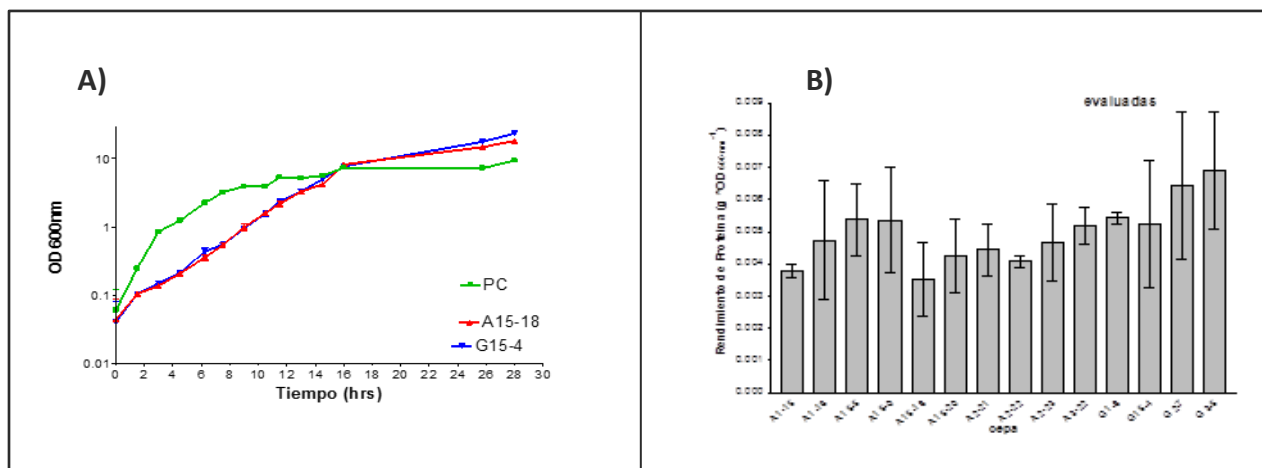


Figura 9. A) Cinéticas de crecimiento de cepas representativas, en verde se observa la cepa parental, en rojo el comportamiento típico de las cepas portando el promotor AOX1 y en azul las cepas portando el promotor PPGAP. B) Resultados de rendimiento de las mejores cepas productoras.

6.3. Evaluación de las cepas NTS

El primer y único experimento de selección para las candidatas portando las inserciones cromosomales en los *loci* NTS se realizaron cinéticas sencillas, crecidas en medio BMGY con 2 g L⁻¹ de glicerol y en medio rico en glucosa para la expresión de proteína. En total 7 candidatas fueron obtenidas después de la confirmación por PCR de la inserción genómica (**Figura 6**). Cinco candidatas tienen el genotipo de X-33-pPIC5 (con clave X5P) y dos candidatas tienen el genotipo de la cepa MG4-pPIC5 (clave 45P) **Tabla 3**.

En la **Figura 10** se muestran los resultados obtenidos de estas cinéticas de selección. Dos cepas exhibieron comportamientos deseables, el título más grande lo presenta la cepa **X5P-V** mientras que el rendimiento es superior para la cepa **45P-1**.

Muchos trabajos reportados anteriormente se conforman con evaluar el título final de la proteína tras 48 a 72 horas de inducción (Noseda *et al.* 2014; Cereghino *et al.* 2002; Khasa *et al.* 2007; Müller *et al.* 2016; Liu *et al.* 2016; He *et al.* 2015), sin embargo, se ha observado que la proteólisis de la proteína recombinante puede ocurrir si las fuentes de nitrógeno escasean, por lo que este trabajo se concentra más en evaluar los rendimientos *a priori* a los títulos de proteína, ya que en los modos de operación a gran escala para el sistema pGAP, el rendimiento es el parámetro más utilizado (Looser *et al.* 2014). Por lo que este parámetro junto con la velocidad de crecimiento durante la fase de producción permite contrastar mejor las diferencias en los perfiles de producción, en suma, se buscan cepas con un rendimiento alto a una tasa de crecimiento alta (Liu *et al.* 2013). Ya que todas las cepas evaluadas en esta sección presentan velocidades de

crecimiento muy parecidas, entre 0.11 y 0.13 h⁻¹, en la **Figura 10** solo se muestra los títulos de proteína y el rendimiento.

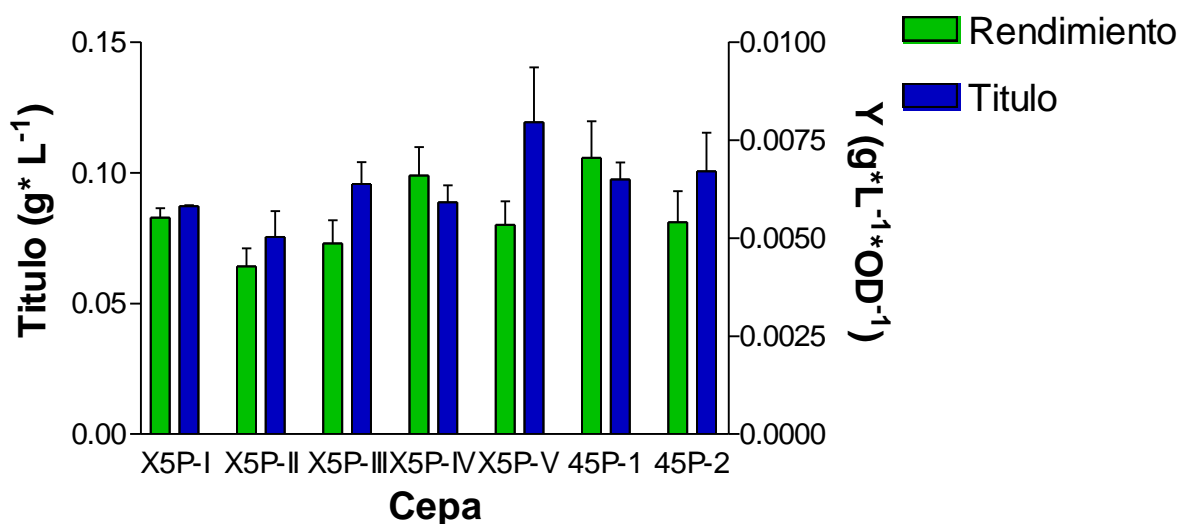


Figura 10. Resultados de mapeo de producción para las cepas portando el plásmido pPIC5. Rendimientos y títulos de proteína de RY son mostrados como el promedio de dos replicas independientes.

Se observa que casi todas las candidatas evaluadas presentan títulos y rendimientos muy cercanos entre ellas, además los rendimientos son ligeramente superiores a los reportados en la sección anterior para las candidatas generadas por el método PTVA, **figura 9**. Esto probablemente se deba a varios factores, bastante variación entre los diferentes bloques de experimentos o a que efectivamente existe un componente de origen genético. Por su parte las candidatas generadas por el método de inserción vía NTS sufrieron un solo evento de inserción, en diferentes *loci*, por lo que cargan menos errores generados por las integraciones inespecíficas, lo cual suele ser común (Aw & Polizzi 2016) cuando se desarrollan cepas mediante el fenómeno

de hiperresistencia, los mecanismos moleculares subyacentes a estos fenómenos han sido estudiados por (Schwarzans *et al.* 2016). Estos fenómenos por lo general ocasionen un decremento en la expresión del gen de interés (Aw & Polizzi 2016; Aw & Polizzi 2013).

Aunque a primera vista las candidatas X5P-V y 45P-1 aparentan tener títulos y rendimientos superiores a los observados en las candidatas generadas por el método PTVA. Es deseable evaluar a las candidatas seleccionadas como las mejores productoras de cada construcción en un bloque de cinéticas a aparte, en modelos de cultivos más cercano a las condiciones que usualmente se utilizan en escala más grande.

Realizando varias inducciones, controlando el pH a lo largo del cultivo, en un sistema muy parecido al fedbatch a nivel bioreactor, controlando de una forma más fina los tiempos de inicio de la producción y analizando los patrones de producción de la RY. Por lo tanto, se seleccionaron 4 cepas, las dos mejores del bloque anterior, la A15-22 y la G3-5 y se compararon contra las dos mejores productoras de este bloque, la X5P-V y la 45P-1. con esta evaluación se espera encontrar la mejor cepa produciendo RY, para conducir análisis de mejoramiento de las condiciones del medio de cultivo y de cultivo en biorreactor, como normalmente se reporta.

6.4. Evaluación de altas productoras de RY.

Por último, tras seleccionar a las mejores cepas en rondas continuas de selección, se obtuvieron una cepa sobre-productora portando el promotor pAOX1 (A15-22) y tres cepas con el promotor pGAP, ya sea por proceso PTVA (G3-5) o por inserción vía NTS (X5P y 45P-1).

Las cepas fueron evaluadas bajo el mismo método descrito anteriormente. Sin embargo, se hicieron algunas modificaciones al protocolo de inducción para evaluar a detalle el perfil de producción en cinéticas de larga duración. Una vez alcanzada la densidad óptica de inducción (entre 6 y 10 OD_{600nm}) se realiza la inducción, y cada 11 h se agrega más inductor (0.5% p/v de metanol o 2% p/v de glucosa, concentración final). En experimentos anteriores se observó que tras la inducción con glucosa el pH baja drásticamente de 6.5 a 3-4 debido al metabolismo fermentativo de *Pichia*, la alta densidad celular y/o baja eficiencia de aireación. El descenso de pH afecta de manera negativa la producción de proteína recombinante (Zhao *et al.* 2008).

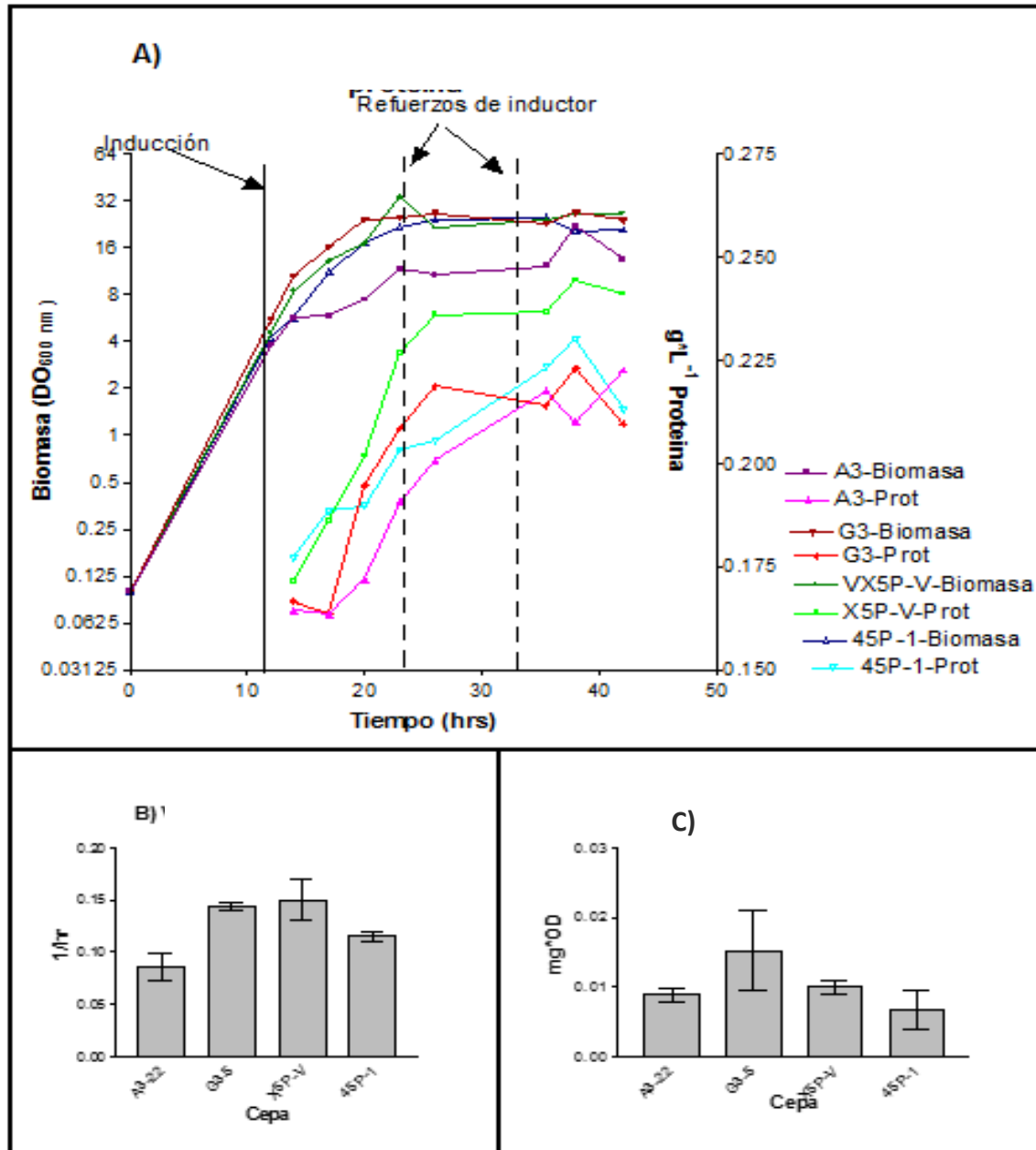


Figura 11. Evaluación de cepas sobreproductoras. A) perfiles de crecimiento y de producción de proteína, b) Velocidades de crecimiento, C) Rendimientos

Para resolver esto, se decidió disolver la glucosa en buffer fosfatos 0.1 M pH 7.0, con el fin de mantener el pH constante, durante la fase de producción. En la **Figura 11**, se muestran los resultados obtenidos, en la evaluación de las cepas sobreproductoras, con la finalidad de concluir por fin cual construcción molecular es la adecuada para producción de RY.

En la **Figura 11A**, se puede observar como las cepas sobreproductoras evaluadas poseen la misma μ_{\max} , aprox. 0.30 h^{-1} con excepción de la cepa A15-22, las cepas son inducidas al final de la fase exponencial, a una OD cerca de 10, mientras que la cepa A15-22 no logra alcanzar esta densidad hasta mucho tiempo después. La razón por la cual se debe esta diferencia fisiológica no se tiene claro, y hasta el momento no se han reportado los efectos sobre la fisiología celular que pueden causar el proceso PTVA, sin embargo, en este estudio se observa claramente como divergen las características de dos cepas que estuvieron bajo el mismo estrés fisiológico.

Después de la inducción metanol/glucosa, los perfiles de crecimiento cambian, volviéndose específico para cada cepa. Las velocidades más altas, cerca de 0.15 h^{-1} , las presentan las cepas G3-5 y X5P-1 en las cuales también se observan tasas de producción de RY superiores. Es lógico esperar que las cepas inducidas con glucosa presenten velocidades de crecimiento más altas, ya que en los sistemas genéticos bajo la expresión de pGAP, la producción de proteína se relaciona de forma positiva con el crecimiento celular, por lo que para estos sistemas se buscan cepas con velocidades de crecimiento altas como tasas de producción considerables (Vogl & Glieder 2013; Looser et al. 2014), tal como lo podemos observar para la cepa G3-5, cuyo rendimiento y productividad están ligeramente por arriba de la cepa X5P, y cuyas velocidades de crecimiento son similares.

Para este caso se eligió la cepa G3-5, sin embargo, tanto está como la cepa X5P-V presentan casi los mismos valores de producción, lo que representa que la estrategia de inserción por NTS resulta ser una opción conveniente, más sencilla y menos costosa que el proceso PTVA. Al final puede arrojar cepas sobreproductoras al mismo nivel que el método tradicional sin necesidad de procesos de selección intensivos.

En lo que respecta al sistema de AOX, solo para este caso la estrategia de inducción de la expresión por metanol no parece ser conveniente, se observa que el título, los rendimientos y tasas de producción son inferiores. Sin embargo, fue necesario evaluar hasta este nivel de detalle las características de cada sistema para poder elegir que construcción molecular y sistemas de expresión resultaban más adecuadas. Además, los bioprocesos dependientes de la inducción con metanol este reactivo se vuelve un verdadero problema, ya que a concentraciones altas dentro de la célula >5% p/v resulta ser un reactivo tóxico para la célula, generando una respuesta de estrés que es contraproducente para la expresión de proteína recombinantes (Liu *et al.* 2013; Vogl & Glieder 2013; Barrigon *et al.* 2015).

6.5. Mejoramiento de las condiciones de cultivo.

Posteriormente se llevaron a cabo estudios de optimización de condiciones de cultivo, donde se evaluaron tres medios de cultivo diferentes (M1: YPD, M2: BMGY y M3: Medio mineral), y dos temperaturas diferentes para la fase de expresión (25 y 30°C). Tomando únicamente la cepa elegida para el proceso de escalamiento, la cepa G3-5 se evaluó en seis escenarios diferentes. Este set de experimentos tuvo como objetivo definir los parámetros esenciales de operación a escala mayor: el medio de cultivo y la temperatura de inducción. **Figura 12.**

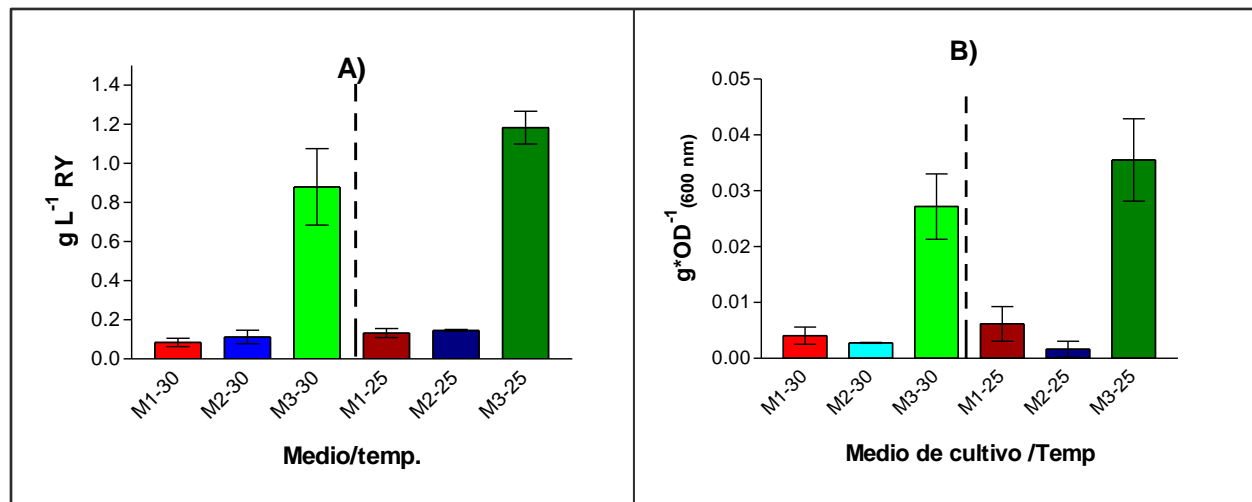


Figura 12. Optimización del medio de cultivo y temperatura de expresión de RY para la cepa sobreproductora G3-5. A) Títulos b) Rendimientos. M1: YPD, M2: BMGY, M3: MG, 25: 25°C y 30: 30°C

En la **figura 12**, se observa claramente que el medio mineral (M3) presenta títulos y rendimientos muy superiores tanto a 30 como a 25°C, siendo esta segunda temperatura la adecuada para la expresión de proteína recombinante, como ya lo han reportado varios trabajos con anterioridad, revisado por (Liu *et al.* 2013; Sreekrishna *et al.* 1997; Looser *et al.* 2014; Potvin *et al.* 2012a). Tanto el medio mineral como la temperatura de expresión de 25°C presentan ventajas adicionales en costo y facilidad operativa.

En la cuestión de costos es donde podemos observar una diferencia notoria entre usar alguno de los tres medios estudiados. El costo por litro del YPD es 107 pesos, el BMGY es de 340 pesos y el de medio MMG es de 248 pesos. Aunque la diferencia en costos entre el medio del BMGY y del MMG es de apenas 100 pesos, cuando tomamos en cuenta la producción de proteína en ambos medios, se puede calcular cuánto cuesta producir un gramo de RY por cada litro de medio

utilizado. Para el caso del BMGY cuesta 2,334 pesos cada gramo de proteína producido en un litro de medio de cultivo, en contraste en el medio MMG cuesta 209 pesos producir un gramo de RY en un litro de medio, lo que representa casi 10 veces menos el costo en comparación al BMGY.

En cuestiones operativas, cultivar *Pichia* en grandes volúmenes de BMGY presentan una dificultad, ya que uno de los componentes principales del medio, el YNB, solo puede ser esterilizado por filtración. El YNB representa el 10% del volumen total, una cantidad significativa, si se trabaja con reactores de más de 1 L de volumen de operación, lo que también dificulta su adicción al biorreactor post esterilización, ya que la operación pone en riesgo la esterilidad del cultivo. Por estas razones el medio mineral es el más utilizado a nivel piloto e industrial (Ghosalkar *et al.* 2008).

6.6. Cultivos en biorreactor.

Para los cultivos en biorreactor se utilizó un inóculo de al menos 36 h de la cepa G3-5. Para iniciar las cinéticas se añade las vitaminas, elementos traza y el inóculo, este último debe ser suficiente para iniciar la cinética con 0.1 OD_{600 nm}, siguiendo el protocolo reportado por Buchetics *et al.* (2011) para el cultivo de *Pichia pastoris* en la fase de generación de biomasa. Aunque varios autores comienzan las cinéticas a densidades ópticas mayores de entre 0.5 y 1 OD_{600nm} con la finalidad de disminuir la fase de adaptación y alcanzar títulos finales de biomasa superiores, no es una práctica aconsejable ya que disminuye la reproducibilidad entre experimentos (Cereghino & Cregg 1999; Higgins & Cregg 1998). Aunado a esto, el utilizar grandes cantidades de inóculo hace que se arrastren nutrientes y contaminantes ajenos al medio de cultivo mineral, lo que puede afectar el perfil de crecimiento, sustancias como acetato o etanol pueden afectar los estadios iniciales de crecimiento de *Pichia pastoris* (Mehmet & Meagher 2001).

En la **Figura 11A** se puede ver que de 10 a 12 h dura la fase lag. Posteriormente tendrá 12 h de fase exponencial hasta haber agotado la fuente de carbono (se visualiza el *spike* del oxígeno disuelto). La fase exponencial comienza cerca de las 3 OD's y alcanza de entre 40 y 50 OD's, cerca de las 24 h del cultivo. Durante este periodo el oxígeno disuelto decae linealmente, hasta que llega a concentraciones por debajo del 10% donde es necesario la compensación con O₂ y N₂, para mantener la concentración en aproximadamente 30%. Las mezclas de O₂/N₂ con aire debe de ser de alrededor de 60 a 80 mL min⁻¹.

En cuanto se observa el pico de oxígeno disuelto se comienza la fase de producción (Buchetics *et al.* 2011). Esto ocurre generalmente entre 24 y 28 h de haber iniciado el cultivo, en una densidad óptica de entre 30 y 40.

Se enfocó en encontrar la concentración de oxígeno disuelto adecuada para una mayor producción de proteína, ya que no existe un consenso, más bien parecería que depende de la proteína producida, pero en general se manejan rangos de 30 a 60%.

Sin embargo, Adelantado *et al.* (2017) analizó la producción de proteínas recombinantes y las consecuencias fisiológicas en la célula en condiciones hipóxicas aproximadamente 10% de O_d durante la fase de producción, sus resultados apuntan a que la baja disponibilidad de oxígeno es favorable para la expresión y secreción de proteínas al medio extracelular, por ello fue interesante incluir un nivel más en el experimento de aeración. Se analizaron cuatro niveles de % de O_d: >50, 40, 30 y <10%. Los resultados de las corridas se muestran en la **Figura 13**. Cada nivel posee al menos dos replicas, en eventos independientes.

En este set de experimentos se observó una clara correlación entre la concentración de O_d durante la fase de producción y la expresión de la proteína RY, entre más bajo es el porcentaje

de oxígeno disuelto mayor es la producción de proteína recombinante. En la **Figura 13A** se observa que en las cuatro condiciones la fase de crecimiento es casi igual, presenta la misma μ de 0.22 h^{-1} . Después del periodo de inducción las curvas de crecimiento son muy parecidas, con excepción del tratamiento de <10% que curiosamente alcanza una densidad óptica mayor, cerca de $70 \text{ OD}_{600\text{nm}}$.

En la **Figura 13B** podemos ver que el título de proteína en la condición de <10% es casi el doble que el nivel de 30%, condición de oxígeno que la mayoría usan para expresar proteínas usando pPPGAP. Los resultados en la **Figura 11C** están en concordancia, a la misma proporción, debido a que la tasa de crecimiento de *Pichia* es muy similar durante la fase de producción. Cerca de 0.03 h^{-1} .

Para la mejor condición encontrada en este bloque de experimentos se transformaron los datos de rendimiento producto-biomasa ($Y_{p/x}$) y productividad específica (q_p), de acuerdo al procedimiento estandarizado por Looser *et al.* (2014). Esta transformación nos permite comparar los resultados generados en este trabajo contra otros previamente reportados. Para $Y_{p/x}$ el valor es de 212 miligramo de RY por cada gramo de biomasa, esto se obtiene al graficar el título de proteína contra la biomasa, se puede observar que la producción de proteína tienen una relación lineal con la generación de biomasa, por lo que se cataloga a este tipo de cinética como acoplada al crecimiento, este tipo de comportamiento es algo típico de los sistemas de expresión bajo el control del promotor pGAP (Looser *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2009).

En el caso de la productividad específica (q_p), se obtiene mediante el producto del rendimiento $Y_{p/x}$ y la μ durante la fase de protección; el valor para la condición de <10% de O_d es de 5.25 miligramos de RY por cada gramo de biomasa en peso seco producidos en una hora.

Este parámetro nos permite comparar la eficiencia de cultivo de este bioproceso contra otros previamente reportados por Looser *et al.* (2014), este ejercicio se ilustra en la **Tabla 5**. En esta se compara los resultados obtenidos en este trabajo contra otros previamente reportados y revisados Looser *et al.* (2014). La parte más obvia es la diferencia en los modos de operación utilizados por otros autores con el sistema pGAP, los cuales se prefiere el cultivo continuo. Por dificultades técnicas y falta de tiempo no fue posible implementar el cultivo continuo en este trabajo, sin embargo, es una cuestión que se puede plantear en trabajos futuros.

El rango de velocidades de crecimiento reportado para la cepa productora de RY es superior a los reportados en la **Tabla 5**. Esto se debe a que el medio mineral utilizado en este trabajo no es el que típicamente se ha utilizado en trabajos anteriores, el FM22 y el BSM son los medios mínimos más populares (Cereghino *et al.* 2002; Stratton *et al.* 1998). En el 2008 Ghosalkar *et al.* reportaron un trabajo enfocado en optimizar mediante una metodología de superficie de respuesta el medio mínimo mineral con la finalidad de aumentar la generación de biomasa (Ghosalkar *et al.* 2008); el rendimiento final de biomasa fue de 0.55 g g^{-1} y una μ_{max} de 0.23 h^{-1} utilizando el medio optimizado en cultivos en quimiostato, un valor similar a lo reportado en el presente trabajo, **Tabla 5**.

Tanto la composición del medio como la fina regulación del oxígeno disuelto parecen impactar positivamente en la producción de RY, ya que el valor de productividad específica se encuentran muy arriba a lo reportado por otros autores, 5.25 vs 0.49 (el valor más alto reportado por otros autores), **Tabla 5**. Aunque comparar la producción entre diferentes proteínas no es algo que se pueda hacer de forma tan directa, si es evidente que los valores reportados en este trabajo están por encima hasta por un orden de magnitud. Muy seguramente estos valores pueden mejorarse al escalar el proceso y cambiar el modo de operación.

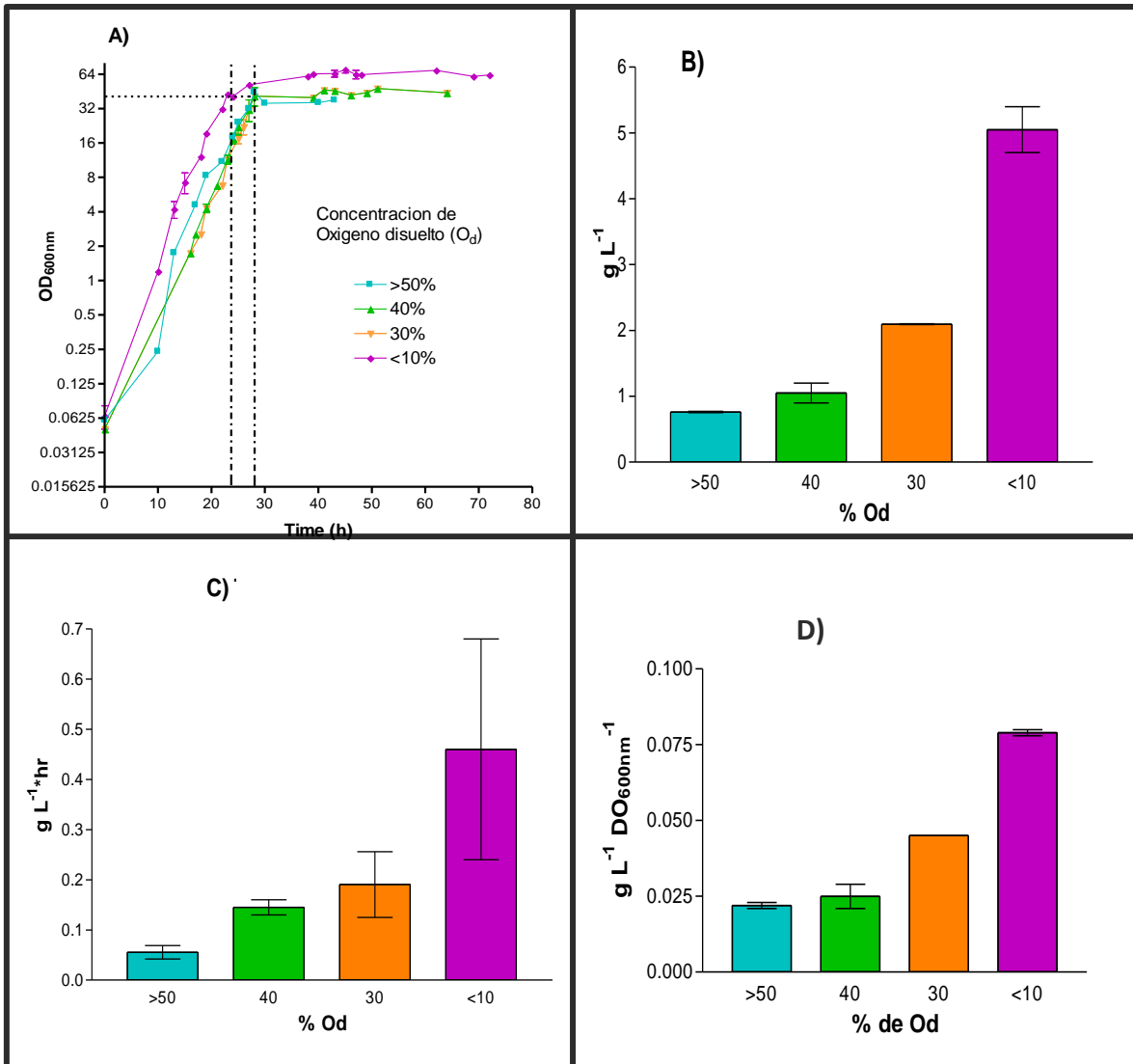


Figura 13. Resultados de los experimentos de las cinéticas en biorreactor, modo fedbatch. A) cinéticas de crecimiento, bajo diferentes concentraciones de O_d en la fase de producción. B) Títulos finales de proteína, C) tasa de producción y D) rendimiento.

Tabla 5. Tabla comparativa de resultados de cultivos en biorreactor este trabajo contra otros previamente reportados. Se compara condiciones de cultivo y valores cinéticos. Adaptado de Looser *et al* (2014).

PROTEINA PRODUCIDA	CONDICIONES DE CULTIVO					CINÉTICAS DE FORMACIÓN DE PRODUCTO				
	Promotor	Medio	Temp. (°C)	pH	Modo	rango de μ (h ⁻¹)	μ (q_p max) (h ⁻¹)	q_p max (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	Cinética	Referencia
ALBUMINA DE SUERO HUMANO	AOX1	Definido	30	5.85	Fedbatch	0.002-0.027	0.002	0.26	Negativamente al crecimiento	kobayashi <i>et al</i> (2000)
SAXATILINA	AOX1	Definido	30	5	Fedbatch	0.004-0.021	0.004	0.023	Negativamente al crecimiento	min <i>et al.</i> (2010)
ANTICUERPO (IGG1)	AOX1	Complejo	24	6.5	Fedbatch	0.003-0.03	0.014	0.17	Forma de campana	Potgieter <i>et al</i> (2010)
ALBUMINA DE SUERO HUMANO	PPGAP	Complejo	25	5.85	Continuo	0.015-0.15	0.15	0.15	Acoplado al crecimiento	Rebnegger <i>et al.</i> (2014)
FRAGMENTO FAB (ANTI VIH, 2F5)	PPGAP	Definido	25	5	Continuo	0.02-0.19	0.19	0.49	Acoplado al crecimiento	Maurer <i>et al</i> (2006)
FRAGMENTO FAB (HUMANO, 3H6)	PPGAP	Definido	25	5	Continuo	0.02-0.19	0.19	0.05	Acoplado al crecimiento	Buchetics <i>et al.</i> (2011)
HG-CSF (HUMANO)	PPGAP	Complejo	30	5	Continuo	0.02-0.2	0.2	0.49	Acoplado al crecimiento	Khasa <i>et al.</i> (2007)
ROYALACTINA	PPGAP	Definido	25	5.5	Fedbatch	0.11-0.23	0.15	5.25	Acoplado al crecimiento	Este trabajo

7. Conclusiones

Este trabajo ha presentado la generación, y caracterización de una cepa de *Pichia pastoris* productora de RY. Comparado a los reportes anteriores la cepa G3-5 presenta el título más alto reportado hasta el momento de Royalactina, en comparación a la cepa reportada por Ibarra C. *et al.* 2014 representa un incremento de 23 veces, muy cercano a lo predicho por Torres-Acosta *et al.*, 2015.

Durante el proceso de desarrollo de la cepa también se reporta la utilización de un método alternativo para la inserción de cassettes de expresión dentro del genoma de *Pichia*, en regiones ribosomales (NTS). Como se describe en este trabajo, este método requiere menos tiempo y trabajo para generar cepas hiperresistentes con integraciones del gen de interés. Al final las candidatas generadas por ambos métodos de inserción arrojan resultados muy parecidos, por lo que el método alternativo puede ser útil en futuros trabajos.

Esta cepa generada presenta características más atractivas para el escalamiento del proceso. Una expresión más fuerte y robusta del gen ry, con un inductor menos toxico para la célula y de más fácil manejo en escalas más grandes. Además el medio de cultivo se presenta más eficiente, produce 5 veces más, y el costo beneficio de este es evidente, cuesta diez menos producir 1 gramos de proteína con el medio mineral que con el medio BMGY (este medio también es ocupado en la cepa CI4 (Ibarra-Herrera *et al.* 2014).

8. Recomendaciones.

Además de los resultados presentados aun es necesario desarrollar algunos datos más:

- Se requiere montar ensayos biológicos en los cuales se pruebe la actividad de la proteína producida en *Pichia pastoris* en contraste a la proteína nativa contenida en la jalea real. Kamakura (2011); Shen *et al.* (2015) ya establecieron protocolos para evaluar el efecto de la Royalactina en *D. melanogaster*.
- Es necesario realizar pruebas de purificación de la proteína, pruebas previas en el laboratorio muestran que la RY tiene rendimientos bajos de recuperación usando los métodos normales de purificación. Una alternativa a explorar es la ya reportada por Ibarra-Herrera *et al.* (2014) en la cual se recupera RY mediante el sistema de ATPS (sistema de dos fases acuosa) teniendo recuperaciones cercanas al 80%, se tendrían que validar estos rendimientos con la producción de la cepa aquí reportada.
- Como se explica en la sección de cultivo en bioreactores, por lo general los sistemas controlados por el promotor pGAP se cultivan en modo continuo. Ya que la producción de RY esta acoplada a la generación de biomasa, suena lógico que el modo continuo, donde se tiene un crecimiento sostenido sin variar el volumen del cultivo, sea una opción interesante a explorar para aumentar la producción de RY

Apéndice A

Abreviaciones y Acrónimos

Tabla A. 1 Abreviaciones

Descripción	
Pp	Pichia pastoris
RY	Royalactina

Tabla A. 2 Acrónimos

Descripción	
MRJP1	Major Royal Jelly Protein 1
rpm	revoluciones por minuto
g's	Gravedades
OD	Optical Density (densidades opticas)
VVM	Volume Vessel per Minute (volumen del envase por minuto)
%W/V	Porcentaje peso volumen

Apéndice B

Variables y Símbolos

Tabla A. 3 Variables y símbolos

Variable	Descripción	Unidades
O_d	Oxígeno disuelto en el medio	%
μ	Velocidad de crecimiento	h^{-1}
$Y_{x/p}$	Rendimiento producto biomasa	$mg_{\text{producto}} \cdot g^{-1}_{\text{biomasa}}$
q_p	Productividad específica.	$mg_{\text{producto}} \cdot g^{-1}_{\text{biomasa}} \cdot h^{-1}$

9. Bibliografía

- Adelantado, N. et al., 2017. The effect of hypoxia on the lipidome of recombinant *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 16(86), pp.1–15. Available at: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-017-0699-4>.
- Ahmad, M. et al., 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), pp.5301–5317.
- Aw, R. & Polizzi, K.M., 2013. Can too many copies spoil the broth? *Microbial cell factories*, 12(128), pp.1–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3878197&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- Aw, R. & Polizzi, K.M., 2016. Liquid PTVA: a faster and cheaper alternative for generating multi-copy clones in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 15(29), pp.1–11. Available at: <http://www.microbialcellfactories.com/content/15/1/29>.
- Barrigon, J.M., Valero, F. & Montesinos, J.L., 2015. A macrokinetic model-based comparative meta-analysis of recombinant protein production by *Pichia pastoris* under AOX1 promoter. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(6), pp.1132–1145.
- Buchetics, M. et al., 2011. Reverse Engineering of Protein Secretion by Uncoupling of Cell Cycle Phases From Growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10), pp.2403–2412.
- Buttstedt, A., Moritz, R.F.A. & Eler, S., 2014. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biological Reviews*, 89(2), pp.255–269.
- Cereghino, G.P.L. et al., 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotech*, 13(4), pp.329–332.
- Cereghino, G.P.L. & Cregg, J.M., 1999. Applications of yeast in biotechnology: Protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), pp.422–427.
- Chen, D. et al., 2016. Evaluation of the major royal jelly proteins as an alternative to fetal bovine

- serum in culturing human cell lines. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 17(6), pp.476–483. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4913796/>.
- Cornara, L. et al., 2017. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Frontiers in Pharmacology*, 8(412). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5487425/>.
- Damasceno, L.M., Huang, C.J. & Batt, C.A., 2012. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), pp.31–39.
- Fratini, F. et al., 2016. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological Research*, 192, pp.130–141. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.007>.
- Fujita, T. et al., 2013. Proteomic Analysis of the Royal Jelly and Characterization of the Functions of its Derivation Glands in the Honeybee. *Journal of Proteome Research*, 12(1), pp.404–411. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/pr300700e>.
- Ghosalkar, A., Sahai, V. & Srivastava, A., 2008. Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production. *Bioresource Technology*, 99, pp.7906–7910.
- He, D. et al., 2015. Combined use of GAP and AOX1 promoters and optimization of culture conditions to enhance expression of *Rhizomucor miehei* lipase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(8), pp.1175–1182.
- Heyland, J. et al., 2011. Carbon metabolism limits recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8), pp.1942–1953.
- Higgins, D.R. & Cregg, J.M., 1998. *Introduction to Pichia pastoris*,
- Huang, C.J. et al., 2011. A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(1), pp.235–247.
- Ibarra-Herrera, C.C. et al., 2014. Recovery of major royal jelly protein 1 expressed in *Pichia pastoris* in aqueous two-phase systems. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89(7), pp.941–947.

-
- Jahic, M. et al., 2006. Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 22(6), pp.1465–1473.
- Júdová, J. et al., 2004. Transformation of Tobacco Plants with cDNA Encoding Honeybee Royal Jelly MRJP1. *Biologia Plantarum*, 48(2), pp.185–191. Available at: <http://dx.doi.org/10.1023/B:BIOP.0000033443.60872.f1>.
- Júdová J, Klaudiny J, S.J., 1998. Preparation of recombinant most abundant protein MRJP1 of royal jelly. *Biologia (Bratisl)*, 53, pp.7778–7784.
- Kamakura, M., 2011. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 473(7348), pp.478–483. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10093>.
- Kamakura, M., Suenobu, N. & Fukushima, M., 2001. Fifty-seven-kDa Protein in Royal Jelly Enhances Proliferation of Primary Cultured Rat Hepatocytes and Increases Albumin Production in the Absence of Serum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(4), pp.865–874. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X0194656X>.
- Khasa, Y.P. et al., 2007. Kinetic studies of constitutive human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) expression in continuous culture of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 29(12), pp.1903–1908.
- Kim, H., Yoo, S.J. & Kang, H.A., 2015. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Research*, 15(1), pp.1–16.
- Kohno, K. et al., 2004. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68(1), pp.138–145.
- Kucharski, R., Foret, S. & Maleszka, R., 2015. EGFR gene methylation is not involved in Royalactin controlled phenotypic polymorphism in honey bees. *Scientific Reports*, 5(August), pp.11–16. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep14070>.
- Liu, L. et al., 2013. How to achieve high-level expression of microbial enzymes: Strategies and perspectives. *Bioengineered*, 4(4), pp.212–223.
- Liu, W.-C. et al., 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, pp.1–12. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep18439>.
- Looser, V. et al., 2014. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, 33(6), pp.1177–1193. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>.
- Mandacaru, S.C. et al., 2017. Characterizing the Structure and Oligomerization of Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1) by Mass Spectrometry and Complementary Biophysical Tools. *Biochemistry*, 56, pp.1645–1655.
- Mannoor, M.K. et al., 2009. Honeybee royal jelly inhibits autoimmunity in SLE-prone NZB x NZW F1 mice. *Lupus*, 18(1), pp.44–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074168>.
- Mao, R. et al., 2015. Optimization of expression conditions for a novel under the control of the GAP promoter in *Pichia pastoris* X-33. *BMC Microbiology*, 15(57), pp.1–12.
- Marx, H. et al., 2009. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. *FEMS Yeast Research*, 9(8), pp.1260–1270.
- Maurer, M. et al., 2006. Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *microbial*, 5(37), pp.1–10.
- Mecklenbräuker, A. et al., 2011. *Characterization of novel promoters in Pichia pastoris*.
- Mehmet, I. & Meagher, M.M., 2001. The Effect of Ethanol and Acetate on Protein Expression in *Pichia pastoris* The Effect of Ethanol and Acetate on Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(4), pp.337–341.
- Melicherová, K. et al., 2016. Optimization of the fermentation and downstream processes for human enterokinase production in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101(5), pp.1927–1934.
- Müller, J.M. et al., 2016. GAP promoter-based fed-batch production of highly bioactive core streptavidin by *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 32(4), pp.855–864. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.2283>.

-
- Nosedá, D.G. et al., 2014. Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia* (Komagataella) *pastoris* under methanol-inducible AOX1 promoter. *Protein Expression and Purification*, 104, pp.85–91. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2014.09.014>.
- Nozaki, R. et al., 2012. A rapid method to isolate soluble royal jelly proteins. *Food Chemistry*, 134(4), pp.2332–2337. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.106>.
- Potvin, G., Ahmad, A. & Zhang, Z., 2012a. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris* : A review. , 64, pp.91–105.
- Potvin, G., Ahmad, A. & Zhang, Z., 2012b. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 64, pp.91–105. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.017>.
- 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), pp.2925–2938.
- Qin, X. et al., 2011. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), pp.3600–3608.
- Qin, X. et al., 2011. Reliable high-throughput approach for screening of engineered constitutive promoters in the yeast *Pichia pastoris*. *Letters in Applied Microbiology*, 52(6), pp.634–641.
- Ran, F.A. et al., 2016. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*, 154(6), pp.1380–1389. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>.
- Rebner, C. et al., 2014. In *Pichia pastoris*, growth rate regulates protein synthesis and secretion, mating and stress response. *Biotechnology Journal*, 9(4), pp.511–525. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/biot.201300334>.
- Sauer, M. et al., 2004. Differential gene expression in recombinant *Pichia pastoris* analysed by heterologous DNA microarray hybridisation. *Microbial Cell Factories*, 3(17), pp.1–14. Available at: <http://www.microbialcellfactories.com/content/3/1/17/abstract%5Cnhttp://www.microbialcellfactories.com/content/3/1/17%5Cnhttp://www.microbialcellfactories.com/content/p>

df/1475-2859-3-17.pdf.

Schwarzans, J.P. et al., 2016. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microbial Cell Factories*, 15(84), pp.1–15.

Shen, L. et al., 2015. Determination of royal jelly freshness by ELISA with a highly specific anti-apalbumin 1 , major royal jelly protein 1 antibody. *biomed*, 16(2), pp.155–166.

Shen, L. et al., 2010. Expression of Recombinant AccMRJP1 Protein from Royal Jelly of Chinese Honeybee in *Pichia pastoris* and Its Proliferation Activity in an Insect Cell Line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), pp.9190–9197. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/jf1007133>.

Simúth, J., 2001. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie*, 32, pp.69–81.

Spohner, S.C. et al., 2015. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 202, pp.118–134. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.027>.

Sreekrishna, K. et al., 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 190(1), pp.55–62.

Stadlmayr, G. et al., 2010. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *Journal of Biotechnology*, 150(4), pp.519–529. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.957>.

Stratton, J., Chiruvolu, V. & Meagher, M., 1998. High cell-density fermentation. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. pp. 107–120.

Sunga, A.J., Tolstorukov, I. & Cregg, J.M., 2008. Posttransformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*, 8(6), pp.870–876.

Tokunaga, K. et al., 2004. Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 27(2), pp.189–192.

Torres-Acosta, M.A. et al., 2015. Economic analysis of royalactin production under uncertainty:

-
- Evaluating the effect of parameter optimization. *Biotechnology Progress*, 31(3), pp.744–749.
- Viuda-Martos, M. et al., 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73(9), pp.117–124.
- Vogl, T. & Glieder, A., 2013. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnology*, 30(4), pp.385–404. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.010>.
- Vogl, T., Hartner, F.S. & Glieder, A., 2013. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6), pp.1094–1101. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.024>.
- Wu, S. & Letchworth, G.J., 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *DRUG DISCOVERY AND GENOMIC TECHNOLOGIES*, 36(1), pp.1–3.
- Zhang, A.L. et al., 2009. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Reports*, 36(6), pp.1611–1619.
- Zhang, W. et al., 2000. Modeling *Pichia pastoris* Growth on Methanol and Optimizing the Production of a Recombinant Protein , the Heavy-Chain Fragment C of Botulinum Neurotoxin , Serotype A. *Papers in Biotechnology*, 60, pp.271–276.
- Zhao, W. et al., 2008. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(3), pp.189–195.

**Héctor Manuel Castañeda Aponte**

Edad: 26 años

Dirección: C. Havre #2916, Col. Narvarte.

Ciudad: Monterrey, NL.

☎: 777-184-9519

✉: emeth29@gmail.com**Perfil Profesional**

Ingeniero en Biotecnología, con tres años de experiencia laboral asistiendo y coordinando proyectos biotecnológicos, áreas de producción, investigación y desarrollo.

Experiencia profesional**2015 (Sep-Dic) Laboratorio de Investigación en Biotecnología. UPEMOR**

Cargo: Colaborador de investigación y desarrollo de proyectos.

Función: Validación de métodos de diagnóstico molecular (RT-PCR), optimización de bioprocesos, manejo de bacteriófagos.

2015(Mar-Ago) Laboratorio de Bioquímica de la Nutrición. INSP

Cargo: Analista del laboratorio de Bioquímica de la Nutrición.

Función: Manejo de equipo instrumental como Inmunoanalizador: Architech-Abbott
Asistencia técnica en línea de producción. Manejo de bases de datos.

2013-2014 Agromod Invitro. Tapachula, Chiapas

Empresa: Empresa agro-alimentaria. Dedicado a la producción masiva de plantas elite.

Cargo: Colaborador de investigación.

Función: Encargado de optimización de procesos y recursos, mejora continua.
Planeación y ejecución de experimentos, análisis de datos, manejo de personal.

2012-2014 Agromod Invitro. Tapachula, Chiapas

Empresa: Empresa agro-alimentaria. Dedicado a la producción masiva de plantas elite.
Cargo: *Encargado /Supervisor de producción.*
Función: Manejo de la planta productiva in-vitro, supervisión de indicadores, análisis de datos, planeación de la producción, elaboración de medios de cultivo y manejo de equipo de laboratorio.

Formación académica

2016-Actual. **Maestría en Ciencias con Especialidad en Biotecnología.** Cursando actualmente
Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM).
Grupo de Bioprocesos y Biología Sintética.

2008-2012 Ingeniería en Biotecnología. Ced. Profesional: 7814583.
Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
Biotecnología enfocada en Bioprocesos, con módulos de especialidad y materias por competencias.

2011 Laboratorio de Biosistemas y Biología Sintética.
Cinvestav-Irapuato.
Estadía, proyecto de tesis. Manejo de técnicas moleculares como clonación, PCR, manejo de ácidos nucleicos y proteínas. De mayo a diciembre del 2011.
Tutor: Dr. Agustino Martínez Antonio.

2009-2011 IBT-UNAM. Cuernavaca, Morelos
Centro de Investigación. Laboratorio de Ingeniería de vías metabólicas. IBT-UNAM. (Tutores: Dra. Karla Martínez, Dr. Francisco Bolívar Zapata).
Servicio social y prácticas profesionales
Funciones: Manejo de cultivos celulares de bacterias, ensayos enzimáticos, uso de biología molecular, búsqueda bibliográfica, manejo de HPLC (Waters),

espectrofotómetro, autoclaves, balanza analítica, bioreactores, cámaras de incubación, etc.

Idiomas

Idioma 1: inglés fluido. Certificación TOEFL: 580 pts.

Otros datos de interés

Publicaciones:

Karla Martínez-Gómez, Noemí Flores, Héctor M Castañeda, Gabriel Martínez-Batallar, Georgina Hernández-Chávez, Octavio T Ramírez, Guillermo Gosset, Sergio Encarnación and Francisco Bolivar (2012).

Microbial Cell Factories, 11, art. no. 46. Impact factor 3.55. Highly accessed flagged.

<http://www.microbialcellfactories.com/content/11/1/46>

Cursos:

*Taller de Biología sintética y estadía de tesis de licenciatura. Mayo a diciembre del 2011. Laboratorio de Biosistemas y Biología Sintética; Cinvestav-Irapuato. Tutor: Agustino Martínez Antonio.

*Ponencia de trabajo de investigación. Noviembre del 2010. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.

*Presentación de trabajo en el Primer Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias. Marzo 2010.

This document was typed in using Microsoft Word by **Hector M. Castañeda-Aponte (Student)**