

***Pichia pastoris* una alternativa para la producción de glicoproteínas humanas de uso terapéutico. Estrategias de Fermentación.**

***Pichia pastoris* one alternative for human glycoprotein production of therapeutic use. Fermentation strategies.**

Proteínas humanas recombinantes, estrategias de fermentación

Henry Córdoba Ruiz¹, Néstor Algecira Encizo², Raúl Poutou Piñales³, Luis Alejandro Barrera Avellaneda⁴

RESUMEN

La producción de proteínas humanas en células de organismos inferiores, usando tecnología recombinante, es una muy prometedora aproximación para el tratamiento de muchas enfermedades producidas por la deficiencia de una proteína en particular, entre ellas cerca de 40 enfermedades de almacenamiento lisosomal. Aunque *Escherichia coli* (*E. coli*) fue el primer hospedero empleado con éxito para expresar proteínas humanas recombinantes, tiene algunas limitaciones, causadas principalmente por su inhabilidad para hacer algunas modificaciones post-traduccionales, tales como la glicosilación. Debido a esto, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) fue considerada y usada inicialmente para tales propósitos. Sin embargo, *S. cerevisiae* glicosila proteínas de manera muy diferente a las células humanas, produciendo proteínas altamente antigénicas; por este motivo algunas otras levaduras no-convencionales tales como *Pichia pastoris* (*P. pastoris*), han sido recientemente usadas. En este sistema, la expresión de proteínas humanas no está asociada al crecimiento; puede crecer a altas densidades celulares, aumentando la productividad y el rendimiento de la proteína heteróloga; tiene un promotor muy eficiente, inducible por adición de metanol, el cual puede ser usado como única fuente de carbono y energía. Las modificaciones post-traduccionales parecen más semejantes a las células humanas, que las de otros sistemas no mamíferos usados para la producción de glicoproteínas humanas y no secretan considerables cantidades de proteínas endógenas, lo cual simplifica la purificación de la proteína expresada. En esta revisión se presentan estrategias para la producción de proteínas heterólogas, en cultivos de alta densidad, empleando *P. pastoris* como sistema de expresión.

Palabras clave: estrategias de fermentación, glicoproteínas humanas, *P. pastoris*, proteínas recombinantes.

ABSTRACT

¹Ingeniero Químico. Profesor Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana. Estudiante Maestría en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia. Teléfono 320-8320 Ext. 4034. hcordoba@javeriana.edu.co

²Magíster en Ingeniería Química. Profesor Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia. Ciudad Universitaria, Facultad de Ingeniería. Teléfono 316-5000 Ext. 14101. nalgecira@ing.unal.edu.co

³Magíster en Microbiología. Instituto de Errores Innatos del Metabolismo. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Teléfono 320-8320 Ext. 4024. rp000274@javeriana.edu.co

⁴Doctor en Bioquímica. Director Instituto de Errores Innatos del Metabolismo. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Teléfono 320-8320 Ext. 4099. abarrera@javeriana.edu.co

The production of human proteins in cells of lower organisms using recombinant technology is a very promising approach for the treatment of many diseases produced by a particular protein deficiency, among them close to 40 lysosomal storage diseases. Although *E. coli* was the first host employed successfully to express human recombinant proteins it has some limitations owing especially to its inability to do some postranscriptional steps such as glycosilation. Due to that reasons the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) was considered and used initially for such purpose. However *S. cerevisiae* glycosilate proteins in a very different manner than the human cells producing proteins highly antigenic, and for that reason some other non conventional yeasts such as *Pichia Pastoris* has been recently used. In this system the expression of human proteins is not associated to grow, it may grow at high cellular concentration increasing the productivity and yield of the heterologous proteins; it has a very efficient promotor, inducible by methanol, which may be used as a sole source of carbon and energy. The postranscriptional modifications seem more similar to the human cells than other non mammalian system used for the production of human glycoproteins and it does not secrete considerable amounts of endogenous proteins which simplify the purifications of the expressed protein. In this review we present some strategies for the production of heterologous proteins in high density cultures using *P. pastoris* as an expression system.

Key Words: fermentation strategies, human glycoprotein, *P. pastoris*, recombinant protein.

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento del modelo del ADN por Watson y Crick en el año 1953 se ha avanzado mucho en su manipulación y aplicaciones. Numerosas investigaciones han permitido un mejor entendimiento de como el ADN y otras moléculas portan y transmiten la información genética. Desde comienzos del siglo pasado, se sabe que algunas enfermedades ocurren debido a fallas metabólicas, por deficiencia en una enzima, proteína ausente o menos activa que la proteína normal; lo anterior es debido a mutaciones en los genes que codifican la síntesis de esas proteínas. Este conocimiento ha estimulado a muchos investigadores en la búsqueda de alternativas para el tratamiento de enfermedades genéticas empleando la terapia de reemplazo enzimático. Hasta el momento se ha usado exitosamente la terapia de reemplazo enzimático para las enfermedades de Gaucher, Fabry y se está en las etapas finales de investigación y aprobación para varias enfermedades más, entre las cuales se encuentran el síndrome de Hurler, la enfermedad de Hunter, la de Pompe, la de Morquio A y la de inmunodeficiencia adquirida.

El síndrome de Gaucher es una enfermedad lisosomal caracterizada por la acumulación de glucosilceramidas, en concordancia con el hecho de que la glicoproteína glucocerebrosidasa no hidroliza eficientemente esta sustancia a ceramidas y glucosa. La disminución de la actividad se debe a una mutación del gen q21, quien codifica su síntesis y, que se encuentra en el cromosoma 1. La terapia para esta enfermedad está siendo realizada con muy buenos resultados, suministrando exógenamente la enzima. La producción industrial a gran escala de la glucocerebrosidasa, se efectuó inicialmente extrayendo la enzima a partir de placenta humana, para posteriormente modificar sus cadenas glicosiladas (alglucerasa); mas tarde, se fabricó, mediante la expresión del ADNc humano, en células de ovario de hamster. Esto último hizo posible producir suficiente

enzima para el tratamiento permanente de cerca de 4000 personas, con un costo aproximado de 380.000 US por año, para una persona de 70 Kg (Scriver *et al.* 1996).

Por muchas razones, *E. coli* fue el organismo seleccionado inicialmente para elaborar proteínas recombinantes humanas, como la insulina. En efecto, es un organismo unicelular cuya reproducción es asexual, en la mayoría de los casos; su simplicidad y el conocimiento de su fisiología y genética, hacen que se facilite la expresión y bajen los costos de producción, consistente con una fuente de alimento común y estrategias simples para crecer y mantener el microorganismo. El bajo tiempo de replicación de *E. coli* permite su duplicación en menos de una hora. Se ha presentado en la literatura un modelo estructurado que predice simultáneamente su morfología, crecimiento, rendimiento, composición celular, distribución de la ARN polimerasa y la iniciación de la traducción (Paretti *et al.* 1986).

Al igual que otras bacterias, *E. coli* puede poseer ADN circular y tener uno o varios segmentos adicionales, pequeños, de ADN dentro del citoplasma. Estos segmentos, llamados plásmidos son complementos del genoma, los cuales pueden ser fácilmente aislados y manipulados; también, pueden ser construidos por ingeniería genética, para contener un gen deseado, y transformar con ellos el microorganismo, que produce la proteína foránea, como si ésta fuera nativa. La manera como el plásmido, que es un vector de expresión, usa toda la maquinaria de expresión de un organismo se entendió a partir de comprender cómo los bacteriófagos se reproducen una bacteria (Sawers *et al.* 1996).

Las proteínas que se pueden expresar en *E. coli* pueden provenir de bacterias, hongos, o de células eucariotas. Sin embargo, para que la proteína se produzca, el promotor del gen debe proceder del hospedero, o ser funcional en él. Un promotor es un segmento de ADN localizado corriente arriba del gen. El promotor regula cuándo, en qué cantidad y con qué frecuencia se transcribe un gen o conjunto de genes (Sawers *et al.* 1996). *E. coli* tiene sus desventajas para la producción de proteínas humanas, en razón de que es un procariota y no dispone de mecanismos para hacer la glicosilación de las proteínas luego de la traducción. Esta modificación, que hace parte de las llamadas modificaciones post-traduccionales, se lleva a cabo en más del 90% de las proteínas de mamíferos (Creag, J.M. *et al.* 1987; Sreekrishna, K. *et al.* 1989)

En eucariotes una proteína es frecuentemente modificada después de su producción inicial. Algunas de estas modificaciones pueden ocurrir en diferentes organelos, tales como el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi. Estas modificaciones, en muchos casos, son necesarias para el plegamiento o para la actividad de la proteína. En efecto, por la comprensión que tienen los biólogos moleculares de la fisiología y genética de *S. Cerevisiae*, ésta se usó para producir muchas proteínas de mamíferos y aún cuando tiene muchas limitaciones, es uno de los sistemas de expresión que se ha considerado más promisorio para tal efecto (Tschopp *et al.* 1987; Lin Cereghino *et al.* 1999; Cregg *et al.* 1993).

Los O-oligosacáridos están compuestos de una variedad de azúcares unidos a las proteínas que incluyen galactosa, manosa, N-acetilglucosamina, y posiblemente glucosa; con terminaciones de L-fucosa, N-acetilgalactosamina, ácido siálico y sulfatos. Estas

modificaciones pueden afectar su función o el reconocimiento de la proteína para dirigirla a un sitio específico. Así, la adición de un grupo fosfato al centro de nitrógeno, dirige las hidrolasas al lisosoma (Drickamer *et al.* 1998).

En toda célula eucariota la N-glicosilación se inicia en el retículo endoplasmático con la transferencia de una unidad de enlace lipídico-oligosacárido de residuos de manosa y N-acetilglucosamina. Dado que *E. coli* no glicosila las proteínas, para la expresión de proteínas eucarióticas, se han estudiado otros modelos como células de mamíferos, insectos y levaduras. De estos tres, las células de levadura son las más empleadas, puesto que ellas combinan las características de fácil manipulación genética y rápido crecimiento, propio de los organismos procariota, con una maquinaria sub-celular que realiza la modificación post-traducciona de las proteínas en forma similar a los mamíferos (Lin Cereghino, G.F. *et al.* 2002)

La estructura de oligosacaridos de la invertasa producida en *S. cerevisiae* y *P. pastoris* fue determinada y comparada con la estructura de oligosacaridos de mamíferos (Tschopp *et al.* 1987). *P. pastoris* tiene los mecanismos para adicionar O- N- oligosacáridos a las proteínas secretadas. Los glicanos de la invertasa secretada por *P. pastoris* no tienen el residuo de α -1-3 manosa que es característica en *S. Cerevisiae*, el cual es responsable de la alta naturaleza antigénica de las glicoproteínas secretadas por esta última levadura y por tanto, las hacen no aptas para producir sustancias de uso terapéutico . Respecto a los N-oligosacáridos, la ventaja de *P. pastoris* sobre *S. cerevisiae* está en la glicosilación que realiza, pues ésta se parece más a la que hacen las células humanas. Usando técnicas de perfiles para oligosacaridos se ha demostrado que las cadenas típicas de proteínas secretadas por *P. pastoris* son Man₈ GlcNAc₂ (típica de eucariota superior) y Man₉ GlcNAc₂ (GlcNAc₂= N-actilglucosamina). Se demostró que el contenido de carbohidratos para las cadenas N-oligosacárido parece ser de ocho residuos de manosa por cadena, lo cual hace que la glicosilación hecha sea semejante, al menos en tamaño, a los oligosacáridos de los organismos superiores (Lin Cereghino *et al.* 2000).

Sin embargo, Cregg *et al.* en 1993 advierten en su trabajo que la mayoría de las estructuras de oligosacáridos de la invertasa producida por *P. pastoris* no son las mismas que la de mamíferos y que es necesario determinar su antigénica y la velocidad a la cual es eliminada de la circulación.

EXPRESIÓN EN CÉLULAS EUCARIOTA.

Hace treinta y tres años se describió la habilidad de ciertas especies de levaduras para utilizar metanol como única fuente de carbono y energía. Estas levaduras, llamadas metilotróficas, han llegado a ser los hospederos preferidos para la expresión de genes foráneos (Gellissen , G. 2000). Una de las especies alternativas que ha sido observada es *P. pastoris* (Romanos, M. 1995) (Tabla 5).

Este microorganismo es capaz de generar modificaciones post-traduccionales muy similares a las modificaciones que ocurren en las células humanas. Además, en grandes fermentadores, *P. pastoris* crece en un medio que consiste en una fuente pura de carbono

(glicerol o metanol), biotina, sales, trazas de elementos, agua y no secreta alta cantidad de proteínas endógenas, por consiguiente las proteínas foráneas secretadas por el cultivo son relativamente puras, lo que facilita su separación (Lin Cereghino *et al.* 2000).

Uno de los inconvenientes con *S. cerevisiae* es que no tiene un promotor fuertemente inducible por metanol, del cual si dispone *P. pastoris* por ser una levadura metilotrófica. El primer paso metabólico de este organismo en la utilización del metanol, es su oxidación a formaldehído y peróxido de hidrógeno. Este paso es catalizado por la enzima alcohol oxidasa, AOX. El sitio del gen AOX en el genoma del microorganismo es empleado para insertar por homología o por entrecruzamiento un plásmido de levadura, por ejemplo el pPIC9. Este plásmido contiene el gen de AOX, sobre el cual se hace la inserción del gen que codifica la proteína de interés, como también, un marcador de selección el gen de histidina deshidrogenasa (HIS4), y la señal de secreción, factor α -MF de *S. cerevisiae* (Cregg *et al.* 1985; Cregg *et al.* 1987; Hollenberg *et al.* 1997).

La expresión de una proteína foránea requiere la inserción del gen en un vector de expresión, para introducirlo en el genoma de una cepa de *P. pastoris* y finalmente, identificar por el marcador de selección la efectividad de la transformación. En el genoma de *P. pastoris* existen dos genes alcohol oxidasa, denominados AOX1 y AOX2. Esto hace que se pueda obtener por recombinación cepas con diferentes fenotipos, las que tienen un crecimiento rápido en metanol MUT⁺, crecimiento lento MUT^s y las que no crecen sobre metanol MUT⁻. Cuando la levadura se crece sobre glucosa, glicerol o etanol, no se detecta la alcohol oxidasa en la célula. (Boze, *et al.* 2001; Chauhan, *et al.* 1999 ; Chiruvolu, *et al.* 1997 ; Clare *et al.* 1991 ; Cregg *et al.* 1987; Cregg *et al.* 1989 ; Cregg, *et al.* 1993 ; Sreekrishna, *et al.* 1989 ; Wolf, K. 1996)

Sin embargo, cuando la levadura está creciendo sobre metanol, esta enzima llega a ser el 35% del total de la proteína celular. El control de la cantidad de alcohol oxidasa es en gran parte transcripcional, ya que ningún ARNm de los dos genes es detectable cuando la levadura se crece sobre glicerol (Cregg, *et al.* 1985). Excepto por la cantidad de ARNm presente, mucho más alto ARNm de AOX1 que el de AOX2, los dos genes parecen estar regulados de la misma manera (Cregg, *et al.* 1989). La producción de proteínas foráneas puede ser reprimida hasta cuando el cultivo esté saturado de células, y la producción de la proteína foránea pueda iniciarse con la inducción del gen (Lin Cereghino, G.P. *et al.* 2001).

Muchas proteínas foráneas secretadas por *S. cerevisiae* han mostrado ser antigénicas cuando se introducen en mamíferos, de tal manera que ha sido evitado el uso de glicoproteínas sintetizadas a partir de esta levadura con propósito terapéutico. Por el contrario, las modificaciones post-traduccionales efectuadas por *P. pastoris* son más parecidas a las realizadas en las células humanas; además, es posible regular la producción de la proteína,. Una comparación de proteínas foráneas, secretadas por estas dos levaduras, ha mostrado claras diferencias entre la estructura del enlace N-oligosacárido adicionado a la proteína (Romanos *et al.* 1992).

En los ochenta fue desarrollada una cepa de *P. pastoris* que crece en altas densidades (Phillips Petroleum Co.) (Wegner, G.H. 1983). Desde 1988 muchas compañías farmacéuticas y biotecnológicas han licenciado la tecnología de *P. Pastoris* (Cregg *et al.*

1993; Lin Cereghino *et al.* 2000; Gellissen, G. 2000). Desde 1990 esta compañía ofrece esta tecnología sin ningún costo para la investigación y uso en universidades y organizaciones sin ánimo de lucro, a través de acuerdos de transferencia. Recientemente, el modelo, la cepa GS115[®] que no expresa la proteína histidinol deshidrogenasa (His⁻) y el plásmido pPIC9[®], pueden ser rápidamente obtenidos por una retribución nominal (Invitrogen Co, en San Diego, USA). Para propósitos comerciales esta técnica puede ser licenciada (Research Corporation Technologies, en Tucson, Arizona) (Wolf, K. 1996).

REVISIÓN DE LAS ESTRATEGIAS DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS FORÁNEAS EN *Pichia pastoris*.

P. pastoris crece bien en medios líquidos y sólidos, sobre una amplia variedad de fuentes de carbono. El tiempo de duplicación depende de la fuente de carbono usada; sobre glucosa es de 90 minutos y aproximadamente de 6 horas sobre metanol (Wolf K. 1996). La productividad de *P. pastoris* en matraces agitados es típicamente más baja y se mejora grandemente en cultivos efectuados en fermentador. La primera razón para este comportamiento se fundamenta en que solamente en el medio ambiente controlado de un fermentador, es posible crecer el organismo a altas densidades celulares. La segunda razón se soporta en que el nivel de transcripción iniciada por el promotor de AOX1 es superior en células de *P. pastoris* alimentadas con metanol, a velocidades de crecimiento tales que el cultivo se desarrolle en condiciones controladas de alimentación (Wagner *et al.* 1997; Crowley *et al.* 2000; Almuzara *et al.* 2002).

El crecimiento a bajos pH, el cual reduce el riesgo de contaminación microbiana, es considerado como una de las ventajas de esta levadura para la producción de proteína celular, con el riesgo de proteólisis del producto (Wolf K. 1996). *P. pastoris* crece bien sobre un amplio rango de pH, desde 3 hasta 7, con un mínimo efecto sobre la velocidad de crecimiento. Sin embargo, se ha demostrado un efecto significativo sobre las proteínas recombinantes secretadas, debido a la actividad de las proteasas en el caldo de fermentación (Cregg *et al.* 1993; Inan *et al.* 1999; Files *et al.* 2001). El pH se ajusta mediante la adición de hidróxido de amonio, el cual también es útil como fuente de nitrógeno. Se recomienda que la inducción de la IDS-hr (Iduronato 2-sulfato sulfatasa) se haga a pH de 6, similar al del medio natural donde actúa esta enzima, para no afectar la actividad del producto (Tomatsu, S. 2002).

En el caso de producción intracelular del antígeno de superficie de la Hepatitis B, la adición de trazas de metales (KI, NaMoO₄.2H₂O, CoCl₂.6H₂O a 0.8, 0.2 y 0.5 g/l, respectivamente), pueden facilitar la tolerancia de los microorganismos a mayores tiempos de retención en el fermentador (Wolf K. 1996).

Se han hecho estudios acerca de los efectos de la temperatura en la expresión de proteínas foráneas. La temperatura óptima para la producción de un péptido anticoagulante está entre 26 y 30 °C (Inan *et al.* 1999).

Altas concentraciones de glicerol inhiben la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, disminuyendo su productividad y/o la actividad (Boze *et al.* 2001; Files *et al.*,

2001). Por tanto, es muy importante el desarrollo de estrategias metodológicas para la fermentación. Estas mejoras incluyen modos de alimentación del sustrato para la producción de la enzima recombinante y suministro de oxígeno que permita muy altas densidades celulares sin limitaciones (d'Anjou *et al.* 1997).

La fermentación se puede llevar a cabo de dos modos, en matraces agitados o en fermentadores. El primer modo de fermentación, emplea por lo general medios mínimos o definidos. Esta fermentación, en matraz agitado, se lleva a cabo en dos fases.

La primera fase consiste en crecer el organismo en glucosa o glicerol con temperatura y agitación controladas (Tabla 1). La segunda, corresponde a la inducción de la AOX y producción de la proteína foránea (Tabla 2). El segundo modo de fermentación se puede efectuar en modo continuo en un quimiostato, como también, en lote o lote alimentado. Se encuentran composiciones de medios para el fermentador en la literatura citada y en las diferentes tablas presentadas en este artículo.

Tabla 1. Condiciones de crecimiento en matraz agitado

| Medio | V (ml) | Tiempo (h) | T °C | pH | Agitación | Fenotipo | Referencia |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------|------|-----|-----------|------------------------------------|---------------------|
| Mínimo (YNB®-biotina)- Glicerol 2% v/v- Casaminoácidos 1% | 10 | 8 | 30 | ND | ND | MUT ⁺ | Clare,J.J 1991 |
| Mínimo (YNB®-biotina)-Glicerol 1% v/v | 10 | ND | 30 | ND | ND | MUT ⁺ | Sreekrishna,K. 1988 |
| Complejo (Levadura-peptona)- Glucosa2% | 50 | ND | 30 | ND | ND | MUT ⁺ | Kobayashi, K. 1999 |
| Mínimo (YNB®-biotina-glicerol 2%)- Complejo (Levadura-peptona-glicerol 2%) | 50 | 24 | 30 | ND | 300 | MUT ^S | Chauhan, A.K. 1999 |
| Mínimo (YNB®-biotina)-Glicerol 1% v/v Otro medio para activar el inóculo | 300 | 48 | 30 | ND | 250 | MUT ^S | d'Anjou M.C. 1997 |
| BMGY de Invitrogen®-Glicerol 1% p/v. Describe medio y método para formar banco de trabajo. | 200 | ND | 30 | ND | 200 | MUT ⁺ | Zhang, W. 2000 |
| Mínimo (YNB®)-Glicerol 2% | ND | ND | 30 | ND | ND | MUT ^S | Cregg, J.M. 1987 |
| Mínimo (YNB®-Biotina-Buffer de fosfatos)-Glicerol 1% | 100 | 14 | 30 | 6.0 | 260 | ND | Jahic, M. 2002 |
| Medio salino industrial-Azúcares invertidos por acidificación de malazas de caña 4% | 200 | 16 | 30 | 5.0 | 250 | MUT ^S | Rodríguez, E , 1997 |
| Para activación del inóculo. Sales-Traza de minerales-Biotina-Glicerol 4 % p/v-Buffer de tartrato | ND | 24 | 28 | 5.4 | 80 | MUT ^S | Boze, H. 2001 |
| Complejo (Levadura-peptona)-Glicerol 2 % p/v | 100 | ND | ND | ND | 250 | MUT ^S | Files, D. 2001 |
| Complejo (Levadura-Peptona-Sorbitol)- Glucosa 2% | 25 | 12 | 30 | ND | 200 | MUT ⁺ | Lange, S. 2001 |
| Mínimo (YNB-Biotina)-Glicerol 2 % p/v | 250 | 20 | 30 | ND | 200 | MUT ⁻ ;MUT ⁺ | Chiruvolu,V. 1997 |
| Mínimo (YNB-Buffer)-Glicerol 2 % | 50 | ND | 30 | ND | 200 | MUT ⁺ | Inan, M. 1999 |

ND: No disponible en el artículo

Tabla 2. Condiciones de inducción en matraz agitado

| Medio | V (ml) | Tiempo (h) | T °C | pH | Agitación | Fenotipo | Referencia |
|--------------------------------------------------------------------|--------|------------|------|----|-----------|------------------|---------------------|
| Mínimo (YNB-Biotina)-Metanol 1% | 10 | 48-144 | ND | ND | ND | MUT ⁺ | Clare,J.J 1991 |
| Mínimo (YNB-Biotina)-Metanol 0.5% v/v | ND | 72-96 | 30 | ND | ND | MUT ⁺ | Sreekrishna,K. 1988 |
| Complejo(Peptona- Levadura)-Metanol 2% | 50 | 72 | 30 | ND | 120 | MUT ⁺ | Kobayashi, K. 1999 |
| Mínimo (YNB-Biotina)-Metanol 1% | ND | ND | 30 | ND | ND | MUT ^S | Chauhan, A.K.1999 |
| Mínimo (YNB)- Metanol 0.5% | ND | 200 | 30 | ND | ND | MUT ^S | Cregg, J.M. 1987 |
| Complejo (Levadura-peptona-fosfato de potasio pH 6.0)-Metanol 0.5% | ND | 96 | ND | ND | ND | MUT ⁺ | Lange,S. 2001 |

ND: No disponible en el artículo

En general las estrategias de fermentación del segundo modo consideran las siguientes fases: una primera fase de crecimiento en glicerol en lote, hasta lograr la concentración establecida previamente. Aquí interesa alcanzar rápidamente una alta concentración celular y rendimiento máximo en biomasa; igualmente, se mantienen condiciones de cultivo no limitado por oxígeno, ya que *P. pastoris* en estas condiciones puede acumular etanol o acetato en el medio de cultivo, metabolitos que resultan ser fuertes represores de la AOX (Chiruvolu *et al.* 1997; Inan, M. *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2000) (Tabla 3).

La concentración inicial de sustrato establece la velocidad específica de crecimiento, μ (h^{-1}), una productividad definida (g de producto /g de biomasa h) y un rendimiento biomasa-sustrato, $Y_{x/s}$ (g de biomasa / g de sustrato). Concentraciones superiores a aquella que provoca la máxima velocidad de crecimiento, μ_{max} , disminuyen el rendimiento, la velocidad específica y por limitaciones en la transferencia de oxígeno, se corre el riesgo de acumular metabolitos producto de la degradación anaerobia. Se inicia una segunda fase, de adaptación, en lote alimentado con la fuente de carbono que se usó en la fase anterior, para aumentar la productividad, al disminuir el tiempo de adaptación a metanol (Chiruvolu *et al.* 1997; Files *et al.* 2001) (Tabla 4).

Se ha mostrado que la concentración del producto es aproximadamente proporcional a la concentración de células en el cultivo. Por tanto, se pretende trabajar en cultivos de alta densidad. Una vez se alcanza la densidad celular establecida se inicia la tercera fase, período previo a la inducción, en la cual se hace la inducción del promotor de AOX1 mediante la adición de metanol o mezclas de metanol y la fuente empleada para la fase de crecimiento. Esta fase se realiza en lote alimentado. Un aspecto positivo del comportamiento de *P. pastoris* en un fermentador está en que los niveles de transcripción del gen de AOX es 3 a 5 veces mayor en células crecidas a una velocidad limitada por metanol, que aquellas crecidas con exceso de metanol (Lin Cereghino *et al.* 2000).

En esta tercera fase se puede decir que existen dos estrategias: inducir por “shock” con metanol, esto es, adicionar una cantidad determinada de metanol al cultivo y esperar cuando éste comience a utilizarlo. Esto último se puede observar en la demanda de oxígeno.

Finalmente, en la cuarta fase o fase de producción, se alimenta metanol en flujo continuo, o en pulsos en forma exponencial (Tabla 6). En estas dos últimas fases se debe controlar la concentración de metanol en el medio de acuerdo a los fenotipos empleados, por su diferencia a la tolerancia de este sustrato.

Tabla 3. Condiciones de crecimiento, fermentador en lote, alta densidad

| Medio | V (ml) | Tiempo (h) | T °C | pH | O ₂ Dis. | Flujo de aire | Agitación (rpm) | Fenotipo | Referencia |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------|------|-----|---------------------|---------------|-----------------|--------------------------------------|---------------------|
| Sales-Trazas de minerales-Biotina-Glicerol 5% v/v | 1000 | 24-30 | 30 | 5.0 | >20% | ND | ND | MUT ⁺ | Clare, J.J. 1991 |
| Sales-biotina-Glicerol 2% p/v | ND | ND | 30 | 5.4 | ND | ND | ND | MUT ⁺ | Sreekrisna, K. 1988 |
| Sales-Biotina-Vitamina B1, B6-Pantotenato de sodio-Inositol-Glicerol 5% p/v | 1000 | ND | 30 | | >10% | ND | Variable | MUT ⁺ | Kobayashi, K. 1999 |
| Selectivo (Sales-Glicerol 5%) El pH se controló con solución amoniacal del 25% | 3000 | 30 | 30 | 5.0 | >80% | 1-1.5 vvm | 400-1000 | MUT ^s | Chauhan, A.K. 1999 |
| Sales-Trazas de elementos-Glicerol 5% p/v | 6000 | ND | 30 | 5.5 | ND | 15 (l / min) | 750 | MUT ^s | d'Anjou M.C. 1997 |
| Sales-Glicerol 4% p/v-Traza de minerales-Biotina. El pH se controla con hidróxido de amonio | 2000 | ND | 30 | 5.0 | > 20% | ND | ND | MUT ⁺ | Zhang, W. 2000 |
| Sales-Traza de minerales-Biotina-Glicerol 2% ó 6%. Se usó amoniac para ajustar el pH | ND | ND | 30 | 5.5 | ND | ND | ND | MUT ^s | Cregg, J.M. 1987 |
| Sales-Traza de minerales-Biotina-Glicerol 4% p/v | 3000 | 27 | 30 | 5.0 | 30% | 6 (l / min) | 1000 | ND | Jahic, M. 2002 |
| Medio salino industrial-Azúcares invertidos por acidificación de malazas de caña 4% | 1500 | 18 | 30 | 5.5 | ND | 1 vvm | 250 | MUT ^s | Rodríguez, E. 1997 |
| Sales-Traza de elementos-Biotina-Glicerol 4 %p/v | 1500 | 23 | 28 | 7.0 | >30% | 2 vvm | 500-2000 | MUT ^s | Boze, H. 2001 |
| Sales-Traza de minerals-Glicerol 4 % p/v | 1000 | 22 | 30 | 5.0 | >30% | ND | 1000 | MUT ^s | Files, D. 2001 |
| Complejo (Levadura-peptona-Metanol 0.5 %) | 4000 | ND | 27 | 6.0 | >20% | 7 (l / min) | 400 | MUT ⁺ | Lange, S. 2001 |
| Sales-Glicerol 2 % p/v | 2500 | 20 | 30 | 5.0 | >40% | ND | ND | MUT ⁻ MUT ⁺ | Chiruvolu, V. 1997 |
| FM22-Traza de minerales 1ml-Glicerol 4 % | 700 | 20-24 | 30 | 5.0 | ND | ND | ND | MUT ⁺ | Inan, M. 1999 |

ND: No disponible en el artículo

Tabla 4. Condiciones previas a la inducción en fermentador, alta densidad

| Medio | F | Tiempo (h) | T °C | pH | O ₂ | Flujo de aire | Agitación (rpm) | Fenotipo | Referencia |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------|-------|---------|----------------|---------------|-----------------|--------------------------------------|---------------------|
| Glicerol 50% p/v y 12 ml /l de trazas de minerales | 12 (ml/h) al inicio | 17-24 | ND | ND | ND | ND | ND | MUT ⁺ | Clare,J.J 1991 |
| Traza de minerales-Glicerol 10% p/v | ND | ND | 30 | ND | ND | ND | ND | MUT ⁺ | Sreekrishna,K. 1988 |
| Sales- Glicerol 50% | 10(ml/ L h) | ND | 30 | 5.0 | >60% | 1-1.5 | 400-1000 | MUT ^S | Chauhan, A.K.1999 |
| Metanol 20% v/v | 1.6 g / h | 24 | 30 | ND | 30% | ND | ND | MUT ^S | d'Anjou M.C. 1997 |
| Glicerol 50% v/v | Exponencial | 24 | | | | | | | |
| 12 ml / L de PMT1-Glicerol 50% p/v | 20 g / l h | 1 | 30 | 5.0 | > 20% | ND | ND | MUT ⁺ | Zhang, W. 2000 |
| Adición de 1.5 g de Metanol por litro de caldo. Rampa decreciente de glicerol | Desde 20 g / l h hasta cero. | 2 | | | | | | | |
| Glicerol 555g/l-Traza de minerales 12 ml / l. | 38.5(mL/hr) incrementado a 0.18 ml / h | 3 | 30 | 5.0 | 30% | 6 (L/min) | 1000 | ND | Jahic, M. 2002 |
| Metanol 780. 6 g/l-Traza de minerales 12 ml / l | 10.5 ml / l h incrementado exponencial 0.07 ml / h hasta 24 ml / l h | 1 | | | | | | | |
| Primero se adiciona metanol hasta que éste sea de 1% en el caldo. Luego metanol 100% | 2 (g/L h) | 2 | | 5.2 | ND | ND | 750 | MUT ^S | Rodríguez, E. 1997 |
| Glicerol 50% y 12 ml de traza de minerales por litro | 15 (mL/L h) | 4 | ND | ND | ND | ND | ND | MUT ^S | Files, D. 2001 |
| Glicerol o metanol-Traza de minerales | Varios flujos | 3 | 30 | 5.0 | >40% | ND | ND | MUT ⁻ MUT ⁺ | Chiruvolu,V. 1997 |
| Glicerol 50 % | 0 - 25g/L h. | 4 | 24-32 | 3.0-7.0 | ND | ND | 800 | MUT ⁺ | Inan, M. 1999 |

ND: No disponible en el artículo

El monitoreo de oxígeno permite definir en qué momento se efectúa la inducción, puesto que una vez se agota la fuente de carbono primaria, la concentración de oxígeno aumenta abruptamente. El metabolismo del metanol emplea oxígeno a altas velocidades, entonces la expresión de genes foráneos es positivamente afectada por el suministro de oxígeno. De la misma manera, cuando comienza a ser utilizado el metanol como fuente de carbono, se puede observar una disminución en el oxígeno disuelto. El evento de inducción es crítico, ya que si la inducción se hace en un momento inapropiado (antes de agotarse la fuente primaria de carbono o mucho después), o si el suministro de metanol es excesivo o muy limitado, la respuesta puede ser muy lenta, lo que afecta el desarrollo del cultivo y la expresión de la proteína foránea (Rodríguez *et al.* 1997).

De otro lado, modificando la estrategia de alimentación de los sustratos, el sistema de expresión de *P. pastoris* permite obtener mayores valores en productividad y actividad de las proteínas foráneas expresadas. Esto se consigue iniciando la fermentación en lote hasta el agotamiento de la fuente de carbono más usada, el glicerol. Luego, continuar el crecimiento celular, alimentando glicerol a una velocidad limitada por el sustrato, para consumir metabolitos tales como acetato y etanol que inhiben la expresión del gen.

Estas dos estrategias permiten aumentar la densidad celular, puesto que se requiere alcanzar los más altos valores de masa celular para incrementar la productividad (Tabla 5).

En una segunda fase de producción, se debe lograr la mayor expresión del gen de AOX. Esto se puede lograr con alimentación previa del nuevo sustrato, metanol, en una rampa decreciente, hasta cuando el consumo de oxígeno se incrementa. Esta estrategia permite disminuir los tiempos de adaptación de la levadura al nuevo sustrato y con ello aumentar la productividad. Ahora se debe inducir el gen, alimentando metanol a una velocidad de tal manera que su concentración en el caldo de fermentación sea constante. Hace falta estudiar como afecta la productividad y la actividad de una proteína específica la forma cómo se alimenta el metanol, continuo, o en pulsos (Lin Cereghino, G.P. *et al.* 2002; Chiruvolu, V. *et al.* 1997; Files, D. *et al.* 2001; Rodríguez, E. *et al.* 1997; Zhang, W. *et al.* 2000).

Por lo general todos los estudios referidos indican que la biomasa alcanzada antes de la inducción de la proteína recombinante esta cerca de 52 gramos de células por litro; entre mayor sea la cantidad de células que deban adaptarse al nuevo sustrato, metanol, y por tanto que inician la transcripción del gen AOX, mayor será la producción de la proteína recombinante. Sin embargo, este mecanismo tiene una limitante y es la demanda de oxígeno, el cual se incrementa con la densidad celular y conlleva exigencias para la transferencia de oxígeno desde el gas burbujeado, generalmente aire o éste mismo enriquecido con oxígeno, al caldo de fermentación. La transferencia se puede mejorar, para un fermentador ya diseñado, incrementando el flujo de aire y la agitación, lo cual produce mayor espuma y la necesaria incorporación de antiespumantes aprobados por la FDA o normas similares, para tal efecto (Jahic, M. *et al.* 2002).

Esta levadura crece bien con otros sustratos tales como monosacáridos, alcoholes y aminoácidos (Wolf, K. 1996). El empleo de medios no definidos y de bajo costo, como melazas, además de exigir la hidrólisis previa de disacáridos, incrementa los costos de purificación del producto. En la producción de enzimas humanas, por su alto valor agregado, se justifica el empleo de medios mínimos como los encontrados en la literatura.(Lin Cereghino *et al.* 2000)

Tabla 5. Producción

| PROTEÍNA | CONCENTRACIÓ | BIOMAS | PRODUCTIVIDA | REFERENCIA |
|-----------------------------------------------|----------------|----------|-----------------------|----------------------|
| | N | A | | |
| | g/L | g/L | | |
| Proteína de fusión CBD-lipasa | 1.5 | 160 | ND (140 h) | Jahic, M. 2002 |
| Invertasa glicosilada de <i>S. cerevisiae</i> | 2.6 | 40 | ND (256 h) | Tschopp, J.F. 1987 |
| Fragmento C de Neurotoxina botulínica | 0.77 | 450 | ND (54 h) | Zhang, W. 2000 |
| Antígeno de Superficie de Hepatitis | 0.375 | 59 | ND (225 h) | Cregg, J.M. 1987 |
| Hormona (FSH) | 0.187 | 75 | 0.035 mg / g biom. h. | Boze, H. 2001 |
| Cistatina C humana | 0.778 | 80 | 0.96 mmol / l h | Files, D. 2001 |
| Antígeno de superficie HBsAg | 0.525 | 120 | ND (240 h) | Chauhan, A.K. 1999 |
| Anticongelante de cuervo marino | 0.025 | 80 | 5.1 ng / g biom. H | d'Anjou, M.C. 1997 |
| Dextranasa EC 3.2.1.11 | 5 | 56.2 | ND (120 h) | Rodriguez, E. 1997 |
| Suero albúmina humano (HSA) | 1.4 | 80 | ND (100 h) | Kobayashi, K. 2000 |
| Hirudina | 1.4 | 155 | ND (94 h) | Zhou, X.S. 2002 |
| Péptido anticoagulante (AcAP-5) | Máxima de 1.03 | 115 | ND (90 horas) | Inan, M. 1999 |
| β -Galactosidasa | ND | Máx. 192 | Máx. 12.290 U/ ml h | Chiruvolu, V. 1997 |
| Fragmento C Toxina tetánica | 12 | ND | ND | Clare, J.J. 1991 |
| Fragmento de anticuerpo Fab K411B | 0.04 | ND | ND (96 horas) | Lange, S. 2001 |
| Proteína antitumoral TNF | ND | Máx. 88 | Máx. 5000 U /ml h | Sreekrishna, K. 1989 |

ND: No disponible en el artículo

Tabla 6. Condiciones de producción en fermentador, alta densidad

| Medio | F | Tiempo (h) | T °C | pH | O ₂ Dis. | Flujo de aire | Agitación (rpm) | Fenotipo | Referencia |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------|-------|---------|---------------------|---------------|-----------------|--------------------------|---------------------|
| Metanol 100% y 12 ml / l de Traza de sales | 1 ml/h al inicio | 46-92 | 30 | 5.0 | >20% | ND | ND | MUT ⁺ | Clare,J.J. 1991 |
| Traza de minerales (PMTI)-Glicerol 5% p/v-Metanol 1% | ND | ND | 30 | ND | ND | ND | ND | MUT ⁺ | Sreekrisha, K. 1988 |
| (Sales-Biotina-Tiamina) 2 ml / l de metanol. Concentración < 1% v/v | ND | ND | ND | 5.9 | ND | ND | ND | MUT ⁺ | Kobayashi, K. 1999 |
| Metanol 1%. Casaminoácidos cada 24 h hasta 1% | 1 ml / l h al inicio hasta 3 ml / l h, incrementando cada 24 h | 192 | 30 | 5.0 | >80% | 1-1.5 vvm | 400-1000 | MUT ^S | Chauhan, A.K. 1999 |
| Glicerol 50% v/v-Metanol 20% v/v | ND. velocidad menor al final | 80 | ND | ND | ND | ND | ND | MUT ^S | d'Anjou M.C. 1997 |
| 12 ml de PTM1 por litro de Metanol | < 10 g/l h | 55 | 30 | 5.0 | > 20% | ND | ND | MUT ⁺ | Zhang, W. 2000 |
| PMT1 periódico. Concentración de metanol entre 0.2-1% | ND | 260 | 30 | ND | ND | ND | ND | MUT ^S | Cregg, J.M. 1987 |
| Metanol 780.6 g / l-PTM1 12 ml / l | 24 ml/h | 160 | 30 | 5.0 | 30% | 6 (l / min) | 1000 | ND | Jahic, M. 2002 |
| Metanol 100% | 1) Incremento 0.5 g / l h cuando biomasa incrementa en 10 g en peso seco | 110 | ND | ND | 15-20 | ND | ND | MUT ^S | Rodríguez, E. 1997 |
| | 2) Incremento según ecuación lineal | | | | | | | | |
| | 3) Ajuste según oxígeno disuelto | | | | | | | | |
| Metanol-Biotina. Glicerol-Metanol-Biotina. Metanol-Sorbitol-Biotina-Casamino Ácidos-Levadura-Solución de siete vitaminas-Traza de dos minerales. | Flujo exponencial con $Y_{x/s}=0.30$ $m = 0.010$ | 120 | ND | ND | ND | ND | ND | MUT ^S | Boze, H. 2001 |
| Metanol 100%-PTM1 12 ml / l | 2.25; 1.8 ml/L h; | 70 | ND | ND | ND | ND | ND | MUT ^S | Files, D. 2001 |
| Metanol 40%-Levadura 1%-Peptona 2% | 2.7 ml / h hasta 22.5 ml / h | 92 | ND | ND | 20%-30% | ND | ND | MUT ⁺ | Lange,S. 2001 |
| Glicerol, metanol - Traza de minerales | Varios flujos | 60 | 30 | 5.0 | >40% | ND | ND | MUT- MUT ⁺ | Chiruvolu, V. 1997 |
| Metanol 100%-Levadura 1%-PTM1 4 ml-Biotina 1 ml (200 mg / l) | 3 ml/L h al comienzo | 84 | 24-32 | 3.0-7.0 | 25-60% | ND | 800 | MUT ⁺ | Inan, M. 1999 |

ND: No disponible en el artículo

CONCLUSIONES

A partir de esta revisión se concluye que las mejores condiciones para producir una proteína recombinante, en el modelo de expresión *P. pastoris*, con un fermentador agitado son: temperatura 30°C, pH para la fase de inducción cercano al valor que tiene en el medio natural en el cual la enzima actúa, menor a 7.0 y concentración de oxígeno disuelto mayor al 20%. Asimismo, se consideran cuatro fases para la fermentación: una primera fase, de crecimiento en lote, durante 24 horas y una previa a la inducción, en lote alimentado con flujo de alimentación exponencial, durante una hora, en glicerol y solución básica de sales, hasta conseguir densidades cercanas a 50 gramos en peso seco de células por litro. La tercera fase, de adaptación, en lote alimentado con flujo exponencial, durante dos horas, con metanol y una solución básica de sales. Finalmente, una cuarta fase de producción, en lote alimentado durante 72 horas con el mismo alimento de la fase anterior, empleando diferentes estrategias, por ejemplo, flujo constante o incrementado en pulsos.

P. pastoris es un buen sistema de expresión para expresar glicoproteínas humanas para uso terapéutico. Sin embargo, una vez obtenida la proteína recombinante, es necesario iniciar ensayos a nivel de laboratorio y luego pruebas clínicas, para estudiar la glicosilación del producto y su direccionamiento a las células blanco.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Elizabeth López, PhD, profesora del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por sus orientaciones y comentarios y a Alfonso López, MsC, estudiante de Doctorado del IBT, Universidad Nacional Autónoma de México, por sus indicaciones.

REFERENCIAS

- Almuzara, C., Cos, O., Baeza, M., Gabriel, D. and Valero F., 2002. Metanol determination in *Pichia pastoris* cultures by flow injection analysis. *Biotechnology letters*, **24**:413-417.
- Boze, H., Celine, L., Patrick, Ch., Fabien, R., Christine, V., Yves C. and Guy M., 2001. High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, **36**:907-913.
- Chauhan, A.K., Arora, D. and Khanna, N., 1999. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. *Proc. Biochem.* **34**:139-145.
- Chiruvolu, V., Cregg, J.M., Meagher, M.M., 1997. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb. Tehcnol.*, **21**:277-283.
- Clare, J.J., Rayment F.B., Ballnatine, S.P., Sreekrishna, K. and Romanos, M.A., 1991. High-level expression of tetanus toxin fragment C en *Pichia pastoris* systems containing multiplety tandem integrations of the gene. *Bio/Technology*, **9**: 445-460.
- Cregg, J. M., Barringer, K.J., Hessler, A.Y. and Madden K.R., 1985. *Pichia Pastoris* as a host system for transformations. *Moll. And Cell. Biol.*, **5(12)**: 3376-3385.

- Cregg, J.M., Tschopp, J.F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W.S., Buckholz, R.G., Madden, K.R., Kellaris, P.A., Davis, G.R., Smiley, B.L., Cruze, J., Torregrossa, R., Velicelebi, G. and Thill, G. P., 1987. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, **5**:479-485.
- Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P. and Stillman, C.A., 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. and. Cell. Biol.* **9**(3):1316-1323.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S. and Raschke, W.C., 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, **11**: 905-910
- Crowley, J., McCarthy, B., Nunn, N.S., Harvey, L.M. and McNeil, B., 2000. Monitoring a recombinant *Pichia pastoris* fed batch process using Fourier transform mid-infrared spectroscopy (FT-MIRS). *Biotechnology Letters*, **22**:1907-1912.
- d'Anjou, M.C. and Daugulis, A.J., 1997. A model-based feeding strategy for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology Techniques*, **11**(12):865-868.
- Drickamer, K. and Taylor M.E., 1998. Evolving views of protein glycosylation. *TIBS*, **23**: 321-324.
- Files, D. A, Ogawa, M., Scaman C.H. and Baldwin S.A., 2001. *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme and Microbiological Technology*, **26**:335-340.
- Gellissen, G., 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **54**:741-750.
- Hollenberg, C.P. and Gellissen, G., 1997. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeast. *Current Opinion of Biotechnology*, **8**:554-560.
- Inan, M., Chiruvolu, V., Eskridge, K.M., Vlasuk, G.P., Dickerson, K., Brown, S. and Meagher, M.M., 1999. Optimisation of temperature-glycerol-pH conditions for fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.*, **24**: 438-445.
- Inan, M., Meagher, M.M. (2001) The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. *J. of Bioscience and Bioeng.* **92**(4):337-341
- Jahic M., Rotticci-Mulder, J.C., Martinelle, M., Hult, K. and Enfors, S.O., 2002. Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess Biocat. Eng.* **24**: 385-393.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K. and Ohmura, T., 2000. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *J. of Biosc. and Bioeng.*, **89**(1):55-61.
- Lange, S., Schmitt, J. and Schmid, R.D., 2001. High-yield expression of the recombinant, atrazine-specific Fab fragment K411B by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. of Immuno. Methods.* **255**:103-114.
- Lin Cereghino, G.P., Lin Cereghino, J., Sunga, A.J., Jhonson, M.A., Lim, M., Gleeson, M.A.G. and Cregg, J.M., 2001. New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene*, **263**:59-169

- Lin Cereghino, G.P., Lin Cereghino, J., Ilgen, C. and Cregg, J.M., 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**:329-332.
- Lin Cereghino, J., and Cregg, J.M., 1999. Application of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, **10**: 422-427.
- Lin Cereghino, J., and Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**:45-66.
- Paretti, S.W. and Bailey, J.E., 1986. Mechanistically detailed model of cellular metabolism for glucose-limited growth of *Escherichia coli* B/r-A. *Biotech. and Bioeng.*, **28**:1672-1689.
- Romanos, M., Scorer, C.A. and Clare, J.J., 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**: 423-488.
- Romanos, M., 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression *Current Opinion in Biotechnology*, **6**:527-533.
- Rodríguez, E., Sánchez, K., Roca, H. and Delagado J.M., 1977. Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase. *Biotech. Techniques*, **11(7)**: 461-466.
- Sawers, G. and Jarsch, M., 1996. Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**:1-9.
- Scriver, CH. 1996. The metabolic and molecular bases of inherited disease. CD Rom. Folio Bound VIEWS. Versión 3.11.2. Mc Graw Hill
- Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P. and Parker, K., 1989. High-level expression, purification and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* **28**: 4117-4125.
- Tomatsu, S., 2002. Comunicación personal. Instituto Gifú. Tokio, Japón.
- Tschopp, J.F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W. and Grinna, L., 1987. High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/technology* **5**: 1305-1308.
- Wagner, L.H., Matheson, N.H., Heisey, R.F. and Schneider, K. 1997 Use of a silicone tubing sensor to control methanol concentration during fed batch fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotech. Tech.* **11(11)**:791-795
- Wegner, G.H., 1983. Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities U S 4,414,329.
- Wolf, K., 1996. No conventional yeast in biotechnology. A Handbook. Berlin, Germany, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 203-253
- Zhang, W., Bevins, M.A., Plantz, B.A., Smith, L.A. and Meagher, M.M., 2000. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimising the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotech. And Bioeng.*, **70(1)**:1-8.