

REVISIÓN DE TEMA

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

Review: *Pichia pastoris* represents an alternative for human glycoprotein production for therapeutic use. Fermentation strategies

Henry Córdoba Ruiz*, Néstor Algecira Encizo**, Raúl Poutou Piñales***, Luis Alejandro Barrera Avellaneda****

RESUMEN

La producción de proteínas humanas en células de organismos inferiores, mediante tecnología recombinante es una muy prometedora aproximación al 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 postraduccionales, como la glicosilación. Debido a esto, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) fue considerada y usada al comienzo para tales propósitos. Sin embargo, *S. cerevisiae* glicosila proteínas de manera muy diferente a las células humanas y produce proteínas bastante antigénicas; por este motivo algunas otras levaduras no-convencionales, como *Pichia pastoris* (*P. pastoris*), han sido usadas recientemente. 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 postraduccionales, parecen más semejantes a las células humanas que a 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

Producing human proteins in lower organisms' cells using recombinant technology represents a very promising approach for treating many diseases produced by a particular protein deficiency, including close to 40 lysosomal storage diseases. Although *E. coli* has been the first host successfully employed in expressing human recombinant proteins, it has some limitations owing to its inability to perform some post-traductional steps such as

* Ingeniero Químico. Profesor Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana. Estudiante Maestría en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia. Teléfono 320-8320 Ext. 4034. e-mail: hcordova@javeriana.edu.co

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

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

**** Doctor 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

Recibido: Febrero 10 de 2003. **Aceptado:** Julio 30 de 2003.

glycosylation. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) has thus been initially considered and used. However, *S. cerevisiae* glycosylates proteins in a very different way to human cells producing highly antigenic proteins and thus some other non-conventional yeasts such as *Pichia pastoris* have been used recently. Human protein expression is not associated with growth in this system; growth may occur at high cell concentrations, increasing heterologous protein productivity and yield. The system employs a very efficient, methanol-induced promoter which may be used as sole carbon and energy source. Post-translational modifications seem more similar to human cells than those produced by other non-mammalian systems used in producing human glycoproteins; they do not secrete large amounts of endogenous proteins, simplifying expressed protein purification. This review presents some strategies for producing 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 las aplicaciones. Numerosas investigaciones han permitido comprender mejor cómo portan y transmiten el ADN y otras moléculas 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 se debe 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, que codifica su síntesis y está presente en el cromosoma 1. La terapia para esta enfermedad se aplica con muy buenos resultados, suministrando exógenamente la enzima. La producción industrial a gran escala de la glucocerebrosidasa se efectuó al principio extrayendo la enzima de placenta humana para modificar sus cadenas glicosiladas (alglucerasa). Más tarde se fabricó me-

diante la expresión del ADN humano en células de ovario de hámster. Esto último hizo posible producir suficiente enzima para el tratamiento permanente de cerca de 4000 personas, con un costo aproximado de US 380.000 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 facilitan la expresión y bajan los costos de producción, mediante el uso de 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 aislados y manipulados con facilidad. También pueden ser contruidos 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 en que el plásmido, un vector de expresión, usa toda la maquinaria de expresión de un organismo se entendió a partir de la comprensión de cómo los bacteriófagos 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 procarionta y no dispone de mecanismos para la glicosilación de las proteínas luego de la traducción. Esta modificación, que forma parte de las llamadas modificaciones postraduccionales, se lleva a cabo en más del 90% de las proteínas de mamíferos (Cregg *et al.*, 1987; Sreekrishna *et al.*, 1989).

En eucariotes una proteína es frecuentemente modificada después de su producción inicial. Algunas de estas modificaciones pueden ocurrir en diferentes organelos, 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 de los biólogos moleculares de la fisiología y genética de *S. cerevisiae*, ésta se usó para producir muchas proteínas de mamíferos y aun cuando tiene muchas limitaciones, es uno de los sistemas de expresión más promisorios 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, entre las que se hallan 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 en la expresión de proteínas eucarióticas, se han estudiado otros modelos: células de mamíferos, insectos y levaduras. De estos tres, las células de levadura son las

más empleadas, puesto que combinan características de fácil manipulación genética y rápido crecimiento, propio de los organismos procarionta, con una maquinaria subcelular que realiza la modificación postraducciona de las proteínas en forma similar a los mamíferos (Lin Cereghino *et al.*, 2002)

La estructura de oligosacáridos de la invertasa producida en *S. cerevisiae* y *P. pastoris* fue determinada y comparada con la estructura de oligosacáridos 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 característica en *S. Cerevisiae*, el cual produce la alta naturaleza antigénica de las glicoproteínas secretadas por esta última levadura y, por tanto, las hace 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 oligosacáridos, 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 sea semejante, al menos en tamaño, a los oligosacáridos de los organismos superiores (Lin Cereghino *et al.*, 2000).

Sin embargo, Cregg *et al.* (1993) advierten en su trabajo que la mayoría de las estructuras de oligosacáridos de la invertasa producida por *P. pastoris* son diferentes de la de los mamíferos y que es necesario determinar su antigenicidad 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, 2000). Una de las especies alternativas observada es *P. pastoris* (Romanos, 1995) (tabla 5).

Este microorganismo es capaz de generar modificaciones postraduccionales 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 sí 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 mediante 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 en MUT^s y las que no crecen en metanol MUT⁻. Cuando la levadura crece en 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, 1996).

Sin embargo, cuando la levadura crece en 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 cuan-

do la levadura crece en 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 *et al.*, 2001).

Muchas proteínas foráneas secretadas por *S. cerevisiae* han mostrado ser antigénicas cuando se introducen en mamíferos, de manera que se ha evitado el uso de glicoproteínas sintetizadas a partir de esta levadura con propósito terapéutico. Por el contrario, las modificaciones postraduccionales 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 años ochenta fue desarrollada una cepa de *P. pastoris* que crece en altas densidades (Phillips Petroleum Co.) (Wegner, 1983). Desde 1988 muchas compañías farmacéuticas y biotecnológicas han obtenido la licencia de la tecnología de *P. pastoris* (Cregg *et al.*, 1993; Lin Cereghino *et al.*, 2000; Gellissen, 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) ni el plásmido pPIC9®, puede obtenerse rápidamente mediante una retribución nominal (Invitrogen Co, en San Diego, USA). Para propósitos comerciales se puede obtener la licencia de esta técnica (Research Corporation Technologies, en Tucson, Arizona) (Wolf, 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, en una amplia variedad de fuentes de carbono. El tiempo de duplicación depende de la fuente de carbono usada: en glucosa es 90 minutos y,

aproximadamente, 6 horas en metanol (Wolf, 1996). La productividad de *P. pastoris* en matraces agitados es típicamente más baja y mejora bastante en cultivos efectuados en fermentador. La primera razón de este comportamiento se fundamenta en que sólo en el medio ambiente controlado de un fermentador, es posible producir 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, los cuales reducen el riesgo de contaminación microbiana, es considerado una de las ventajas de esta levadura para la producción de proteína celular, con el riesgo de proteólisis del producto (Wolf, 1996). *P. pastoris* crece bien en 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, 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, 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) puede facilitar la tolerancia de los microorganismos a mayores tiempos de retención en el fermentador (Wolf, 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 o la actividad (Boze *et al.*, 2001; Files *et al.*, 2001). Por tanto, es muy im-

portante el desarrollo de estrategias metodológicas para la fermentación. Estas mejoras incluyen modos de alimentación del sustrato para la producción de la enzima recombinante y el 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, la fermentación en matraz agitado se lleva a cabo en dos fases. La primera fase consiste en producir 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 forma continua en un quimiostato, así como 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.

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 con rapidez 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 *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, $\mu_{m\acute{a}x}$, 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, utilizada 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).

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)-Glucosa 2%	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.

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	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 ⁺	Sreekrisha, K., 1988
Sales-Biotina-Vitamina B1,B6-Pantotenato de sodio-Inositol-Glicerol 5% p/v	1000	ND	30		>10%	ND	Variable	MUT ⁺	Kobayashi ¹ K., 1999
Selectivo (Sales-Glicerol 5%) El pH se controló con solución amoniaca 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 amoniaco 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.

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 positi-

vo 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 producidas a una velocidad limitada por metanol que en aquellas producidas con exceso de metanol (Un 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

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

Medio	F	Tiempo (h)	T °C	pH	O ₂ Dis.	Flujo de aire	Agitación	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 ⁺	Sreekrissha, 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/ h.	4	24-32	3.0-7.0	ND	ND	800	MUT ⁺	Inan, M., 1999

ND: No disponible en el artículo.

al cultivo y esperar a que éste comience a utilizarlo. Esto último se puede observar en la demanda de oxígeno. Finalmente, en la cuarta fase o de producción, se alimenta metanol en flujo continuo o en pulsos exponenciales (tabla 6). En estas dos últimas fases se debe controlar la concentración de metanol en el medio de acuerdo con los fenotipos empleados, por su diferencia a la tolerancia de este sustrato.

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 con-

centración de oxígeno aumenta abruptamente. Como el metabolismo del metanol emplea oxígeno a altas velocidades, la expresión de genes foráneos es afectada de modo positivo 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

Tabla 5. Producción

Proteína	Concentración g/l	Biomasa g/l	Productividad	Referencia
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 botulinica	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)	Rodríguez, 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.

el desarrollo del cultivo y la expresión de la proteína foránea (Rodríguez et al., 1997).

Por otro lado, modificando la estrategia de alimentación de los sustratos, el sistema de producción 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, continúa el crecimiento celular, alimentando glicerol a una velocidad limitada por el sustrato, para consumir metabolitos 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 conseguir 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 adapta-

ción de la levadura al nuevo sustrato y, con ello, aumentar la productividad. Ahora se debe inducir el gen, alimentando metanol a una velocidad tal que su concentración en el caldo de fermentación sea constante. Hace falta estudiar cómo afecta la productividad y la actividad de una proteína específica la forma de alimentar el metanol: continua o en pulsos (Lin Cereghino *et al.*, 2002; Chiruvolu *et al.*, 1997; Files *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000).

Por lo general todos los estudios referidos indican que la biomasa alcanzada antes de la inducción de la proteína recombinante está cerca de 52 gramos de células por litro. Cuanto 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: la demanda de oxígeno, la 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 agita-

Tabla 6. Condiciones de producción en fermentador, alta densidad

Medio	F	Tiempo (h)	T °C	pH	O ₂ Dis.	Flujo de aire	Agitación	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 (PMT1)-Glicerol 5% p/v-Metanol 1%	ND	ND	30	ND	ND	ND	ND	MUT ⁺	Sreekrisna, 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/h al inicio hasta 3 ml/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- PMT1 12 ml/l	24 ml/h	160	30	5.0	30%	6(l / min)	1000	ND 2002	Jahic, M.,
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-CasaminoÁcidos-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/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/h al comienzo	84	24-32	3.0-7.0	25-60%	ND	800	MUT ⁺	Inan, M., 1999

ND: No disponible en el artículo.

ción, lo cual produce mayor espuma y la necesaria incorporación de antiespumantes aprobados por la FDA o normas similares para tal efecto (Jahic *et al.*, 2002).

Esta levadura crece bien con otros sustratos como monosacáridos, alcoholes y aminoácidos (Wolf, 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).

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 actúa la enzima, menor a 7.0 y concentración de oxígeno disuelto mayor de 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 para expresar glicoproteínas humanas de uso terapéutico. Sin embargo, una vez obtenida la proteína recombinante, es necesario iniciar ensayos de laboratorio y pruebas clínicas para estudiar la glicosilación del producto y su direccionamiento a las células blanco.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Elizabeth López, Ph.D., profesora del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por sus orientaciones y comentarios y a Alfonso López, M.S.c. estudiante de

Doctorado del IBT, Universidad Nacional Autónoma de México, por sus indicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Almuzara, C; Cos, O.; Baeza, M.; Gabriel, D.: Valero, F. 2002. Metanol determination in *Pichia pastoris* cultures by flow injection analysis. *Biotechnology Letters*, 24:413-417.
- Boze, H.; Celine, L; Patrick, Ch.; Fabien, R.; Christine, V.; Yves C: Guy, M. 2001. High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 36: 907-913.
- Chauhan, A.K.; Arora, D.; 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. Technol.*, 21: 277-283.
- Clare, J.J.; Rayment, F.B.; Ballnatie, S.P.; Sreekrishna, K.; Romanos, M.A. 1991. High-level expression of tetanus toxin fragment C en *Pichia pastoris* systems containing multiplety tandem integrations of the gene. *BioTechnology*, 9: 445-460.
- Cregg, J. M.; Barringer, K.J.; Hessler, A.Y.; Madden K.R. 1985. *Pichia Pastoris* as a host system for transformations. *Moll. And Cell. Biol.* 5(12): 3376-3385.
- Cregg, J.M.; Tschoop, 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.; Thill, G. P. 1987. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *BioTechnology*, 5:479-485.
- Cregg, J.M.; Madden, K.R.; Barringer, K.J.; Thill, G.P.; Stillman, C.A. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Moll. and. Cell. Biol.* 9(3):1316-1323.
- Cregg, J.M.; Vedvick, T.S.; Raschke, W.C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *BioTechnology*, 11: 905-910
- Crowley, J.; McCarthy, B.; Nunn, N.S.; Harvey, L.M.; McNeil, B. 2000. Monitoring a recombinant *Pichia pastoris* fed batch process using Fourier transform mid-infrared spectroscopy (FT-MIRS). *Biotechnology Letters*, 22:1907-1912.
- d'Anjou, M.C., Daugulis, A.J. 1997. A model-based feeding strategy for feed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology Techniques*, 11(12):865-868.
- Drickamer, K.; 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.; Gellissen, G. 1997. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeast. *Current Opinion in Biotechnology*, 8:554-560.
- Inan, M., Chiruvolu, V.; Eskridge, K.M.; Vlasuk, G.P.; Dickerson, K.; Brown, S.; Meagher, M.M. 1999. Optimisation of temperature-glycerol-pH conditions for fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme 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.; 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.; 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.; 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.; Johnson, M.A.; Lim, M.; Gleeson, M.A.G.; 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.; 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.; Cregg, J.M. 1999. Application of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 422-427.
- Lin Cereghino, J.; Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 45-66.
- Paretti, S.W.; 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.; 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.; Delgado 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.; Jarsch, M. 1996. Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:1-9.
- Scriver, C.H. 1996. The metabolic and molecular bases of inherited disease. CD Rom. Folio Bound VIEWS. Versión 3.11.2. Me Graw Hill
- Sreekrishna, K.; Nelles, L.; Potenz, R.; Cruze, J.; Mazzaferro, P.; Fish W.; Fuke, M.; Holden, K.; Phelps, D.; Wood, P.; 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.; 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.; 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.; 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.