

Usos de la levadura *Pichia pastoris* en la producción de proteínas recombinantes

José García-Suárez^{1,2*} ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2242-8318>

Lourdes Zumalacárregui-de-Cárdenas² ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6921-737X>

Zeila Santana-Vázquez³ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1761-0652>

¹ Centro de Histoterapia Placentaria, La Habana, Cuba.

² Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”, La Habana, Cuba.

³ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

email: jgarcia@miyares-cao.cu

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (clasificada actualmente como *Komagataella phaffii*) es una de las más importantes para la producción de proteínas heterólogas. En el trabajo se presenta un análisis de las principales características que se ponen de manifiesto en la expresión de proteínas recombinantes expresadas en este microorganismo. Se describen las cepas disponibles para la transformación y producción de proteínas recombinantes expresadas en *Pichia pastoris*, los principales vectores comerciales para la expresión, los promotores más eficientes, los marcadores seleccionables, la señal de secreción, los métodos usados en las transformaciones genéticas y los patrones de glicosilación que se presentan. Se brindan recomendaciones generales acerca de los parámetros de bioprocesos como la composición del medio, el pH, la temperatura, la velocidad de aireación, la inducción y las estrategias de alimentación para alcanzar altos valores de productividad. Se presentan los resultados de las aplicaciones de *Pichia pastoris* en la producción de dos vacunas en Cuba, la vacuna contra la hepatitis B y la vacuna para el control de la garrapata.

Palabras clave: vacunas; proteínas recombinantes; levaduras; ingeniería de proteínas.

Introducción

La habilidad de ciertas levaduras de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía se descubrió hace aproximadamente 40 años por Koichi Ogata.⁽¹⁾ En sus inicios, como el metanol se obtenía a partir del metano del gas natural en la industria petrolera en pleno auge, se desarrolló el interés por el uso de levaduras metilotróficas como *Pichia pastoris* para la producción de biomasa y proteína unicelular para la alimentación animal. La crisis del petróleo de los años 70 del pasado siglo hizo este proceso poco rentable por los altos precios del metanol. En las décadas siguientes, la Compañía de petróleo Phillips y el Instituto de Biotecnología de Salk en La Jolla desarrollaron herramientas para la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*.⁽¹⁾

Pichia pastoris, reclasificada como *Komagataella phaffii*,⁽²⁾ es uno de los organismos hospederos más

usados en los últimos años. Lo que se inició como un programa para transformar metanol en una fuente de proteína unicelular para alimento animal, constituye hoy una poderosa herramienta de la biotecnología como modelo de células eucariotas para la biología celular y la producción de proteínas recombinantes. La habilidad de multiplicarse obteniéndose altas densidades celulares en medios no complejos ha propiciado el éxito en fermentaciones a gran escala.⁽³⁾

La expresión de proteínas en *Pichia pastoris* por la tecnología del ácido desoxiribonucleico (ADN) recombinante ha crecido vertiginosamente. El primer biofarmacéutico expresado en esta levadura aprobado por Food and Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés) en el 2009, fue Kalbitor[®], el cual se indica para el tratamiento del angioedema hereditario. Otros productos farmacéuticos como los precursores de insulina, citoquinas y factores de crecimiento como la interleuquina-2, la albúmina sérica humana, el fragmento

* Doctor en Ciencias Farmacéuticas, Investigador Titular, Profesor Titular.

C del toxoide tetánico, entre otros, se han expresado en *Pichia pastoris*.⁽²⁾ Las enzimas líticas industriales⁽⁴⁾ y otras como la invertasa recombinante expresadas en *Pichia pastoris* han mostrado ser más estables que la enzima nativa expresada en *Saccharomyces cerevisiae*.⁽⁵⁾

El interés desarrollado por esta levadura se debe, entre otras características, a su promotor AOX1, promotor del gen que codifica para la enzima alcohol oxidasa (AOX) 1, inducido por metanol; la facilidad y simplicidad de manipulación genética, siendo ya conocidos y bien caracterizados diversos vectores de expresión, comercialmente disponibles; su capacidad para secretar al medio extracelular las proteínas heterólogas producidas; su habilidad para efectuar modificaciones post-traduccionales incluyendo glicosilación, metilación, acilación y formación de puentes disulfuro; la posibilidad de operación a elevadas concentraciones celulares con elevados rendimientos; la potencialidad de crecer en medios de cultivo de costos relativamente bajos y la posibilidad de operar en un ambiente aeróbico, al ser una levadura anaeróbica facultativa, lo que disminuye los efectos negativos de algunos productos secundarios como el etanol.⁽⁶⁾ Es objetivo del presente trabajo realizar un análisis de los factores que afectan la producción de proteínas recombinantes expresadas en *Pichia pastoris*.

Ruta metabólica del metanol en *Pichia pastoris*

La base conceptual para el sistema de expresión de *Pichia pastoris* proviene de la observación de que algunas de las enzimas necesarias para el metabolismo del metanol están presentes a niveles sustanciales, solo cuando las células se cultivan con esta fuente de carbono. Los estudios bioquímicos mostraron que la utilización de metanol requiere una nueva ruta metabólica que involucra varias enzimas únicas. La enzima AOX cataliza el primer paso en la ruta de utilización de metanol: la oxidación de metanol a formaldehído y peróxido de hidrógeno. La enzima AOX se secuestra dentro del peroxisoma junto con la catalasa, que degrada el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Una fracción del formaldehído generado por la enzima AOX deja el peroxisoma y se oxida aún más a formiato y dióxido de carbono por dos deshidrogenasas citoplasmáticas, reacciones que son una fuente de energía para las células que crecen en metanol.

El formaldehído restante se asimila para formar constituyentes celulares mediante una ruta cíclica que comienza con la condensación de formaldehído con

5-monofosfato de xilulosa, una reacción catalizada por la enzima peroxisomal, dihidroxiacetona sintasa (DHAS). Los productos de esta reacción, gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona, abandonan el peroxisoma y entran en una ruta citoplásmica que regenera 5-monofosfato de xilulosa y, por cada tres ciclos, una molécula neta de gliceraldehído 3-fosfato. Dos de las enzimas de la ruta del metanol, AOX y DHAS, están presentes a niveles elevados en las células cultivadas en metanol, pero no se detectan en las células cultivadas en la mayoría de las otras fuentes de carbono (por ejemplo, glucosa, glicerol o etanol). En células alimentadas con metanol a concentraciones limitantes del crecimiento en cultivos en fermentadores, los niveles de AOX se inducen altamente, pudiendo llegar a alcanzar hasta el 30% de la proteína soluble total de la célula.^(7,8)

Cepas disponibles para la transformación y producción de proteínas recombinantes expresadas en *Pichia pastoris*

Todas las cepas de expresión de *Pichia pastoris* derivan de la cepa de tipo salvaje NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL, EU). Los mutantes auxotróficos podrían llevar una auxotrofia tal como GS115 (*his4*), GS190 (*arg4*) o JC254 (*ura3*); dos auxotrofías como GS200 (*arg4*, *his4*) o JC227 (*ade1*, *arg4*); tres auxotrofías como JC300 (*ade1*, *arg4*, *his4*) e incluso cuatro auxotrofías como JC308 (*ade1*, *arg4*, *his4*, *ura3*). Las cepas deficientes en proteasas también están disponibles, como SMD1163 (*his4*, *pep4*, *prb1*), SMD1165 (*his4*, *prb1*) y SMD1168 (*his4*, *pep4*).

Hay tres tipos de cepas hospederas de *Pichia pastoris* disponibles que difieren en cuanto a su capacidad para metabolizar el metanol. Estos son el fenotipo Mut⁺ (cepa salvaje), Muts (lenta utilización de metanol, que resulta de la eliminación del gen *AOX1*) y Mut⁻ (resultante de la eliminación de los genes *AOX1* y *AOX2*). El fenotipo Mut⁺ (es decir, la cepa GS115) se usa principalmente para producciones de proteínas recombinantes, ya que crecen más rápido en metanol, aunque el fenotipo Muts (es decir, la cepa KM71, *his4*, *arg4*, *AOX1*: *arg4*) se ha usado en algunos casos. Otro posible hospedero es la cepa MC100-3 (*his4*, *arg4*, *AOX1*: *SARG4*, *AOX2*: *his4*) que como ha eliminado ambos genes *AOX*, no puede crecer en metanol. Para esta cepa, el metanol solo se usa como inductor cuando se utiliza el promotor AOX1 para inducir la expresión del gen recombinante.⁽³⁾

Vectores comerciales para la expresión de genes recombinantes

Se han desarrollado muchos vectores de expresión para la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*.⁽²⁾ Todos estos son vectores de transporte de *Escherichia coli/Pichia pastoris*. Contienen un origen de replicación para el mantenimiento y la propagación del plásmido en *Escherichia coli*, además del de levadura, así como marcadores seleccionables que podrían usarse en uno o en ambos organismos.⁽¹⁾ La mayoría de estos vectores contiene un sitio de clonación múltiple para la inserción de una secuencia de codificación heteróloga, flanqueada por secuencias promotoras y de terminación, la mayoría derivadas de AOX1. Para la secreción de proteínas recombinantes, estos vectores contienen una secuencia para la fusión entre la proteína recombinante y diversas señales de secreción.⁽¹⁾

Muchos de estos vectores están disponibles comercialmente en Invitrogen Co. Además de estos, otros se han publicado en la literatura como pJL-IX (pAOX1/FLD1), pBLHIS-IX (pAOX1 / HIS4), pBLARG-IX (pAOX1/ARG4), pBLADE (pAOX1/ADE1), pBLURA (pAOX1/URA3) y sus contrapartes de secreción (que contienen la señal peptídica del factor α).⁽³⁾

Promotores utilizados para expresiones génicas recombinantes

Las manipulaciones genéticas moleculares de *Pichia pastoris* tales como la transformación mediada por ADN, la selección de genes, la sustitución de genes y la clonación por complementación funcional son similares a las descritas para otras levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*. *Pichia pastoris* puede transformarse por electroporación a una frecuencia de 10^5 transformantes/ μg de ADN, utilizando el clásico método del cloruro de litio y polietilenglicol; sin embargo, este último tiene un rendimiento menor (10^2 y 10^3 transformantes/ μg de ADN, respectivamente). *Pichia pastoris* tiene una propensión a ADN exógeno. Sin embargo, el reemplazo génico se produce a una frecuencia menor en comparación con *Saccharomyces cerevisiae* y requiere secuencias flanqueantes más largas para la integración directa.⁽³⁾

El éxito de *Pichia pastoris* como plataforma para la producción de proteínas heterólogas se basa principalmente en el promotor fuerte y estrictamente regulado del gen *AOX1*. En *Pichia pastoris*, los genes *AOX1* y *AOX2* codifican para las enzimas AOX, encontrando que *AOX1* representa el 90% de la actividad total de alcohol oxidasa en la célula. Por lo tanto, el promotor *AOX1* se

usa principalmente para controlar la síntesis de proteínas heterólogas. Se reprime en presencia de glucosa, glicerol y etanol y se induce fuertemente en presencia de metanol. Otras fuentes de carbono como el sorbitol no tienen un efecto represivo significativo sobre su inducción. A pesar de que la expresión basada en el promotor *AOX1* presenta varias ventajas, también presenta algunos inconvenientes. En primer lugar, el almacenamiento del metanol es un riesgo de incendio, por lo que su acumulación en grandes cantidades es indeseable. En segundo lugar, como un derivado del petróleo, no es adecuado en los procesos alimentarios. En tercer lugar, su monitoreo en línea es difícil debido a la falta de fiabilidad de las sondas de medición y a que los métodos fuera de línea llevan mucho tiempo. En cuarto lugar, la acumulación de metanol en el caldo de cultivo podría dar como resultado una disminución de la viabilidad celular y la producción de proteína recombinante.

La reducción del flujo de alimentación de este inductor pudiera contrarrestar esta última desventaja evitando que se alcancen concentraciones inhibitorias para la levadura, lo cual deberá ser estudiado en cada caso.

Para reducir el uso de metanol se han desarrollado nuevos promotores alternativos a *AOX1*. Por ejemplo, el promotor de la enzima formaldehído deshidrogenasa, dependiente de glutatión (FLD), se utilizó para impulsar la producción de proteínas heterólogas. FLD1 es una enzima clave del metabolismo del metanol y ciertas aminas alquiladas como la metilamina, por lo que su promotor es inducido por estos dos compuestos a un nivel similar al obtenido con el promotor *AOX1* en presencia de metanol.^(3,9) Se desarrolló un vector de expresión basado en el promotor constitutivo del gen de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAP), sin embargo, los niveles de inducción varían dependiendo de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento celular. No obstante, los niveles de expresión en los medios de glucosa son significativamente más altos que los obtenidos con el promotor *AOX1* en presencia de metanol.⁽³⁾ Otro promotor, el del factor de alargamiento de la traducción constitutiva 1- α (TEF1) ha mostrado un rendimiento similar, o incluso mayor, en proteína recombinante que el promotor de GAP, que proporciona un nivel de expresión comparable al promotor *AOX1*. La enzima FLD1 y el promotor TEF1 pueden eliminar la desventaja relativa señalada al uso del metanol.⁽⁹⁾

Se ha informado un promotor moderado del gen *YPT1* que codifica para la enzima GTPasa implicada en la secreción. Los niveles de expresión que usan el promotor *YPT1* son

de 10 a 100 veces más bajos que los del promotor GAP. Por lo tanto, este promotor es particularmente adecuado para expresar genes que serían tóxicos para las células si se sobreexpresan.⁽³⁾

Un enfoque similar para el nivel de expresión génica moderada se basó en el promotor del gen *PEX8* que codifica una proteína de la matriz peroxisomal que es esencial para la biogénesis de los peroxisomas.⁽⁹⁾

El promotor del gen *AOX2* (versión completa o truncada) se informó en la literatura para dirigir la expresión génica moderada. A pesar de que su nivel de expresión es mucho más bajo que el promotor *AOX1*, Kobayashi et al. demostraron que la adición de pequeñas cantidades de ácido oleico (0,01%) condujo a una producción de proteína dos veces mayor debido a la presencia de un elemento sensible al ácido oleico dentro del promotor *AOX2*.⁽¹⁰⁾

Dos nuevos promotores, PDF (variante comercial del promotor FMD de *Hansenula polymorpha*) y UPP (variante comercial del promotor de *Pichia pastoris* denominado GCW14), han sido presentados como alternativas altamente productivas para procesos recombinantes basados en *Pichia pastoris*.⁽¹¹⁾ Se han publicado otros promotores alternativos como DAS, AOD, SSA4.⁽¹²⁾

Marcadores seleccionables

Se han desarrollado varios marcadores seleccionables para *Pichia pastoris*. Estos son marcadores biosintéticos de la vía de biosíntesis de histidina, concretamente HIS1, HIS2, HIS4, HIS5 y HIS6; la ruta biosintética de la arginina, es decir ARG1, ARG2, ARG3, ARG4 o la ruta biosintética del uracilo, a saber, URA3 y URA5. También se han publicado otros marcadores, como ADE1 (PR-amidoimidazol succinocarboxamida sintasa), MET2 (homoserina-O-transacetilasa) y FLD1.⁽¹³⁾

Otros marcadores seleccionables, basados en genes bacterianos resistentes a antibióticos, podrían ser utilizados en *Pichia pastoris*. Estos son el gen *Shble* (ZeoR), de la bacteria *Streptoalloteichus hindustanus* que confiere resistencia al fármaco de tipo bleomicina Zeocin,^(14,15) el gen de la blastocidina S-desaminasa de *Asperillus terreus* que confiere resistencia a la blastocidina⁽¹⁶⁾ y gen de resistencia a la kanamicina (KanR) que confiere resistencia al antibiótico eucariótico G418.⁽¹⁷⁾ El uso de la combinación de estos marcadores permite integraciones multicopia de un vector de expresión cuando la selección de transformantes se realiza a altas concentraciones de antibióticos.⁽¹⁷⁾

Sin embargo, estos marcadores seleccionables implican la integración de genes de resistencia bacteriana a antibióticos dentro del genoma de *Pichia pastoris* que podría representar un potencial peligro para el ADN tal como la diseminación de estos genes al medio ambiente. Para eludir este inconveniente, se desarrolló un marcador de amplificación basado en el gen *FLD1*. Como se indicó anteriormente, *Pichia pastoris* puede metabolizar metanol como única fuente de carbono y ciertas aminas alquiladas como metilamina y colina como únicas fuentes de nitrógeno. El formaldehído es un intermediario tóxico común en las vías de metanol y metilamina que podría oxidarse aún más a formiato por la enzima FLD1 y al dióxido de carbono por la enzima formiato deshidrogenasa. Así, esta vía oxidativa puede ayudar a que la célula se proteja de los efectos tóxicos de un exceso de formaldehído. Sunga et al. aislaron un mutante de *Pichia pastoris* FLD1 con una mayor sensibilidad al formaldehído y demostró que el nivel de resistencia al formaldehído es proporcional al número de copias del gen *FLD1* presente en esa cepa transformada. Por lo tanto, la utilización de este marcador seleccionable en combinación con este mutante FLD1 permite integraciones multicopia sin ningún riesgo biológico.⁽¹⁸⁾

Señal de secreción

La secreción de proteínas en *Pichia pastoris* requiere la utilización de señales peptídicas que dirigen las proteínas recombinantes a través de la ruta secretora. El factor α prepro-peptido de *Saccharomyces cerevisiae* o las señales de fosfatasa ácida de *Pichia pastoris* (PHO1) son las señales de secreción más utilizadas. Sin embargo, otras señales de secreción, como las de *Rhizopus oryzae* α -amilasa,⁽¹⁹⁾ *Trichoderma reesei* clase 2 hidrofobinas⁽²⁰⁾ y las señales peptídicas endógenas de *Pichia pastoris* PIR1, SCW, DSE y EXG⁽²¹⁾ también se han utilizado con éxito. En algunos casos, se usa la secuencia señal nativa de la proteína recombinante.

Métodos para transformaciones genéticas

Se han desarrollado en *Pichia pastoris* varios métodos para modificaciones genéticas no marcadas, como los que usan URA3 o URA5 como marcador contraseleccionable. Sin embargo, las cepas auxótrofas de uracilo crecen lentamente incluso en medios complementados con uracilo lo que redundará en su utilización difícil y lenta. Para superar esta limitación, se han desarrollado marcadores alternativos contraseleccionables que se pueden usar en la cepa salvaje de *Pichia pastoris*. Uno

de estos es el gen *T-urf13* del genoma mitocondrial del maíz estéril macho utilizado en combinación con el insecticida Methomyl.⁽³⁾ De hecho, la introducción de genes *T-urf13* hace la cepa sensible al insecticida. La toxicidad del gen *T-urf13* puede causar letalidad con ciertas supresiones génicas. Otro método se basa en el uso del gen *mazF* de la toxina de *Escherichia coli* como marcador de contraselección.⁽²²⁾

La principal desventaja de esos métodos es que las alteraciones génicas requieren la construcción de plásmidos y llevar a cabo un rescate de marcador seleccionable que consume tiempo y que deja secuencias repetidas no deseadas en el genoma de *Pichia pastoris*. Pan et al.⁽²³⁾ desarrollaron un método rápido para la eliminación de genes no marcados y el rescate de marcadores basado en el sistema lox Cre/mutado y un gen de resistencia a Zeocina. El cassette de interrupción 5' región objetivo -lox71-Cre-ZeoR-lox66-3' región objetivo se obtiene por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), lo que hace innecesaria la construcción del plásmido. La expresión del gen *Cre* está regulada por el promotor AOX1 y, por lo tanto, se expresa en presencia de metanol. Después de la interrupción génica, la expresión transitoria de la recombinasa Cre permite que lox71 y lox66 se recombinen con la escisión del cassette Cre-ZeoR. El sitio lox híbrido resultante (conocido como lox72) presenta una afinidad de unión reducida para la recombinasa Cre. Este método conduce a una cepa libre de marcadores seleccionables y desprovisto de posibilidad de reordenamiento del genoma.⁽²⁴⁾

Glicosilación de proteínas en *Pichia pastoris*

En contraste con las bacterias, las levaduras son capaces de producir proteínas glicosiladas. Sin embargo, los patrones de glicosilación en levaduras son diferentes de los de eucariotas superiores. *Pichia pastoris* es capaz de añadir restos de carbohidratos ligados a O y N a proteínas secretadas. Sin embargo, los O-oligosacáridos en *Pichia pastoris* se componen de residuos de manosa en contraste con los mamíferos en los que los O-oligosacáridos se componen principalmente de ácido siálico, galactosa y N-acetilgalactosamina. Por otra parte, y en contraste con la mayoría de los eucariotas que agregan los sacáridos ligados a O a los grupos hidroxilo de serina y treonina, *Pichia pastoris* no tiene aminoácidos preferidos para la O-glicosilación. La glicosilación de proteínas en *Pichia pastoris* podría modificar las funciones y características de las proteínas recombinantes producidas, eso podría convertirse en un problema para algunas aplicaciones.⁽²⁴⁾

Por otra parte, la ausencia de ácido siálico en las glicoproteínas conduce a su rápida eliminación del torrente sanguíneo, lo que también puede ser una desventaja para algunas aplicaciones. Para resolver estos problemas, recientemente se han realizado grandes esfuerzos para humanizar la ruta de N-glicosilación en *Pichia pastoris*. Se ha reportado el uso de una estrategia que consiste en la alteración del gen *OCHI* que codifica la α -1,6-manosiltransferasa Och1p, que es responsable de hipermanolisis en levaduras. En una segunda etapa, paso a paso se introducen enzimas heterólogas de glicosilación en el retículo endoplásmico o el complejo de Golgi. Estas enzimas son una α -1,2-manosidasa y dos glucosiltransferasas quiméricas (Ker2-GnTI y Ker2- α -1,4-galactosiltransferasa).⁽²⁵⁾ Para ese propósito, se desarrollaron vectores específicos conocidos como los vectores GlycoSwitch que permiten la conversión de cualquier cepa silvestre de *Pichia pastoris* en cepas que modifican sus glicoproteínas con Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2Nglicanos.⁽²⁶⁾ Además, Li et al. fueron capaces de optimizar la producción de inmunoglobulinas (IgG) humanizadas en una cepa de *Pichia pastoris* modificada genéticamente que presentaba funciones efectoras mediadas por anticuerpos.⁽²⁷⁾

Operaciones y optimización de bioprocesos

Aunque algunas proteínas extrañas se han expresado bien en cultivos de *Pichia pastoris* en zaranda, los niveles de expresión en zaranda son típicamente bajos en relación con los que se pueden obtener en fermentadores. Sólo en el entorno controlado de un fermentador es posible hacer crecer el organismo a densidades celulares altas (> 100 g/L de peso seco o 500 OD600 unidades/mL).⁽²⁸⁾ Especialmente para proteínas secretadas, la concentración de producto en el medio es aproximadamente proporcional a la concentración de células en cultivo. El nivel de transcripción iniciado del promotor AOX1 puede ser 3-5 veces mayor en células de *Pichia pastoris* alimentadas con metanol, a velocidades limitantes del crecimiento en el cultivo de fermentador, en relación con las células cultivadas en exceso de metanol. Por lo tanto, incluso para proteínas expresadas intracelularmente, los rendimientos de producto de una cepa dada como porcentaje de proteínas celulares totales son significativamente mayores a partir de células cultivadas en fermentador.

Por otra parte, el metabolismo del metanol utiliza oxígeno a una velocidad alta, y la expresión de genes extraños se ve negativamente afectada por la limitación del oxígeno. Solo en el ambiente controlado de un fermentador, es factible monitorear y ajustar con precisión el nivel de

oxígeno en el medio de cultivo.⁽²⁹⁾ Por lo tanto, la mayoría de los usuarios del sistema de expresión de *Pichia pastoris* debería producir su proteína extraña en los fermentadores.

Una característica distintiva del sistema de *Pichia pastoris* es la facilidad para el escalado desde el nivel de zaranda hasta los fermentadores de alta densidad.⁽³⁰⁾

Los parámetros de bioprocesos que incluyen la composición del medio, el pH, la temperatura, la velocidad de aireación, la inducción y las estrategias de alimentación son de suma importancia ya que afectan directamente el rendimiento de la producción. Estos parámetros varían según el genotipo de la cepa productora y la proteína recombinante. Sin embargo, hay algunas pautas que permiten altos valores de productividad.

Se ha dedicado un esfuerzo considerable a la optimización de las técnicas de fermentación de alta densidad celular y como resultado, se dispone de una variedad de esquemas de cultivo continuo y discontinuo.⁽²⁸⁾

El medio más comúnmente utilizado para la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* es el medio salino basal (BSM) desarrollado por Invitrogen Co.⁽³¹⁾ Aunque se considera como un estándar, presenta una tendencia a la formación de precipitados por lo que se han desarrollado medios alternativos. Todos los medios definidos se usan en combinación con la solución salina traza PTM1 de Invitrogen Co.⁽³²⁾

El hidróxido de amonio se usa generalmente como la fuente de nitrógeno y para la regulación del pH, mientras que el glicerol y el metanol son las fuentes de carbono y energía preferidas.

La mayoría de las proteínas recombinantes se producen bajo el control del promotor AOX1 en cepas Mut+ de *Pichia pastoris* de acuerdo con un protocolo propuesto por Invitrogen Co. y desarrollado en primer lugar por Brierley et al.⁽³³⁾ Esto incluye una fase discontinua de glicerol (GBP), una fase discontinua alimentada con glicerol (GFBP), una fase de transición (TP) y finalmente una fase de inducción de metanol (MIP). El objetivo de la GBP es acumular células en el mínimo tiempo posible. El glicerol se utiliza como fuente de carbono porque es una fuente de carbono no fermentable y permite una tasa de crecimiento específica máxima más alta que el metanol (0,18 vs 0,14 h⁻¹).⁽³⁴⁾ En GBP, la concentración de glicerol está limitada a 40 gL⁻¹ ya que los valores más altos podrían inhibir el crecimiento celular.⁽³⁵⁾ Cuando el glicerol de GBP se agota como lo indica un fuerte aumento del oxígeno disuelto, comienza la fase GFBP. El glicerol se agrega a una tasa constante, generalmente

igual a la velocidad máxima de consumo de glicerol [0,0688 g (g) ⁻¹].⁽³⁴⁾ El objetivo principal de esta fase es aumentar aún más la concentración celular sin reprimir el crecimiento. Al final de esta fase, se agrega metanol en un modo gradual creciente para aclimatar las células y para desreprimir el promotor AOX1 (fase TP). Finalmente, en la fase MIP, se agrega metanol en el modo discontinuo alimentado a una velocidad de alimentación específica que varía de acuerdo con el genotipo de la cepa *Pichia pastoris* y la proteína recombinante.

El metanol es un reductor de alto grado con alto calor de combustión. Esto conduce a un desafío importante durante la fase de inducción de metanol a gran escala. Debido a que la producción de calor se correlaciona linealmente con el consumo de oxígeno, el desafío es cómo reducir el consumo de oxígeno sin afectar la productividad de la proteína. Una respuesta posible es usar un cosustrato como glicerol,⁽³⁵⁾ glucosa⁽³⁶⁾ o sorbitol⁽³⁷⁾ para reemplazar parcialmente o, al menos, complementar el metanol durante la fase de producción de proteína. El cosustrato más prometedor es el sorbitol porque es un reductor de bajo grado y una fuente de carbono no reprimible para el promotor AOX1. Los beneficios de la alimentación mixta de sorbitol y metanol se han caracterizado ampliamente con el objetivo de reducir el consumo de oxígeno sin pérdida de productividad de proteína. Por ejemplo, Jungo et al. desarrollaron una estrategia de lote alimentado basado en una mezcla de metanol/sorbitol 43/57% M de C.⁽³⁸⁾ Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios para analizar cuantitativamente la fisiología celular durante la alimentación conjunta.^(38,39) La mayoría de ellos se centró solo en el producto final (es decir, proteína heteróloga) sin ningún conocimiento sobre la regulación del promotor AOX1. Niu et al. informaron sobre la caracterización cuantitativa del metabolismo celular de *Pichia pastoris*, con especial énfasis en el proceso de co-alimentación de metanol/sorbitol por intermedio del gen informador *LacZ*, cultivo continuo transitorio y análisis de flujo metabólico.⁽⁴⁰⁾ Sus resultados han demostrado que los consumos de oxígeno específicos de células (qO₂) podrían reducirse disminuyendo la fracción de metanol en los medios de alimentación. Se logró la inducción óptima del promotor AOX1 y se mantuvo en el intervalo de 0,45 a 0,75 de fracción molar de metanol. Además, la qO₂ se redujo en un 30% como máximo en esas condiciones.

La fermentación de alta densidad de las cepas de expresión de *Pichia pastoris* es especialmente atractiva para la producción de proteínas secretadas, debido a que su concentración en el medio de cultivo debe aumentar con la densidad celular. Desafortunadamente,

Tabla 1. Recomendaciones para el diseño del fermentador y parámetros operacionales para *Pichia pastoris* (vvm = volumen de gas/volumen de cultivo/min).⁽²⁹⁾

Parámetro	Recomendaciones
Inóculo	5-10% del volumen total de fermentación.
Temperatura	Hasta 1.000 rpm para sistemas autoclavables a escala de laboratorio; requiere impulsores Rushton y cuatro deflectores removibles para soportar la alta tasa de transferencia de oxígeno. 30°C óptimo; requiere recipientes enchaquetados para la eficiente eliminación del calor de los procesos de alta densidad celular utilizando cepas Mut+ y eventualmente enfriadores adicionales. El recipiente de pared simple y serpetín de enfriamiento solo se recomiendan para baja densidad celular de Mut+ y para Muts y Mut- solamente. El crecimiento por encima de 32°C es perjudicial para la expresión de proteínas. Temperaturas inferiores, hasta 20°C, disminuyen la expresión de proteasas favoreciendo la producción de proteínas heterólogas. ⁽⁴¹⁾
Flujo de gases	Flujo de gas total de 1-1,25 vvm; requiere un múltiple burbujeador de orificios grandes. No se recomiendan mayores tasas de flujo de gas debido a la mayor evaporación de metanol.
Mezclado de gases	Aire y oxígeno; a través del control de la relación de flujo de gas usando un controlador de flujo másico para cada gas, o por control de suplemento de oxígeno con un medidor de flujo másico para el flujo total de gas.
Oxígeno disuelto	35% de saturación de aire; requiere una programación secuencial de control en cascada para la agitación, la mezcla de gases y el sustrato.
pH	5,0 ± 0,1 en las fases continua y continua incrementada de glicerol; 2-5 en la fase de inducción de metanol, dependiendo de la estabilidad de la proteína.
Sustrato 1	Glicerol al 50%, velocidad de alimentación 15 mL/h/L de volumen de cultivo; requiere una bomba peristáltica de velocidad fija o variable para la alimentación volumétrica y una báscula de pesaje opcional para la alimentación gravimétrica o un sistema de adición por presión.
Sustrato 2	Metanol al 100%, velocidad de alimentación 1-12 mL/h/L volumen de cultivo para Mut+ y 1-6 mL/h/L volumen de cultivo para cepas Muts; requiere una bomba peristáltica de velocidad variable con tubería de PTFE o equivalente para alimentación volumétrica, báscula de pesaje opcional para alimentación gravimétrica o sistema de adición por presión. Se requiere un tubo de inmersión completamente sumergido en el medio de cultivo.
Metanol	0,4-4% para las cepas Mut+ y Muts, 0,5% para Mut-. Se recomienda un sensor de metanol en línea o un analizador analítico fuera de línea.
Antiespumante	5% de Struktol JA 673 en 100% metanol, KF0673 Kabo Jackson o equivalente; requiere una bomba peristáltica de velocidad fija.
Base	30% de NH ₄ OH; requiere bomba peristáltica de velocidad fija y tubos de PTFE o equivalente.

las concentraciones de otros materiales celulares, particularmente proteasas, también aumentan.

Un resumen de las recomendaciones para los principales parámetros a considerar en la fermentación se presenta en la Tabla 1.

Producción de proteínas recombinantes para usos biofarmacéuticos y médicos

Durante la década de 1990, solo se produjeron fragmentos de anticuerpos, fragmentos de IgG de cadena simple (scFv) o scFv de fusión, en *Pichia pastoris*. El primer éxito de la producción de IgG de longitud completa se publicó en 1999.⁽²⁶⁾ A pesar de que la IgG era biológicamente activa, se produjo en

la cepa SMD1168 de *Pichia pastoris* (pep4 his4) incapaz de realizar glicosilaciones de tipo humano. Con los avances de la glicoingeniería en la cepa se han notificado altos títulos de anticuerpos de longitud completa con cadenas de glicanos humanizados.⁽⁴²⁾ Se han producido otras proteínas de interés médico en *Pichia pastoris* con diversos rendimientos, entre ellos: precursores de insulina (1,5 gL⁻¹), citoquinas como interleucina 2 (4 gL⁻¹), albúmina sérica humana (6 gL⁻¹), factor de necrosis tumoral (10 gL⁻¹), fragmento de toxina tetánica C (12 gL⁻¹), inhibidor de la coagulación como la variante de hirudina HV2 (1,5 gL⁻¹), proteína antigénica de citomegalovirus pp52 (0,1 gL⁻¹), receptor de serotonina 5HT5A (22 pmol/mg de proteína de

membrana) y receptor μ -opioide humano (400 fmol/mg de proteína).⁽³⁾

VP1 es la proteína estructural principal del norovirus (NoV) y consta de 555 aminoácidos de masa molar aproximada de 60 kDa. Partículas semejantes a virus (VLPs), se han utilizado recientemente como potenciales candidatos vacunales dada su habilidad de producir una respuesta inmune efectiva, tanto humoral como celular. La expresión de VP1 lleva a la formación de partículas con similares características que el virus original. Estas VLPs de NoV se han expresado en *Escherichia coli*, levaduras y células de insectos con formación de cuerpos de inclusión y procesos que requieren muchos pasos de purificación. Tomé et al. expresaron y secretaron VP1 en la cepa *Pichia pastoris* Bg11 usando como vector de expresión pJ912i que contiene el ADN de VP1 de NoV, con un rendimiento mayor que 0,6 g/L. La proteína se purifica a partir del sobrenadante por cromatografía de intercambio iónico y se alcanza una pureza mayor del 90%. Las partículas obtenidas son similares en tamaño, morfología y capacidad de enlace al NoV original. Esto lo señala como un excelente candidato vacunal.⁽⁴³⁾

Un consorcio argentino⁽³⁰⁾ ha reportado resultados de la expresión de la proteína recombinante de unión al receptor (RBD) del coronavirus SARS-CoV-2 en *Pichia pastoris*. Las fermentaciones se realizaron en un biorreactor de tanque agitado utilizando un proceso de cuatro etapas. La primera fue la represión de la expresión de la proteína RBD con glicerol bajo el control del promotor AOX1 y la segunda, la regulación del crecimiento con glicerol como fuente de alimentación según el porcentaje de oxígeno disuelto en el cultivo, con un corte de saturación del 60%. Posteriormente se alimentó con una mezcla de glicerol: metanol (3:1), permitiendo así la adaptación de las células para el crecimiento en presencia de metano. Finalmente, la etapa de inducción se realizó mediante la

adición de metanol puro (suplementado con 12 mL/L) en cultivo incrementado alcanzando rendimientos superiores a 45 mg/L de proteína pura al 90%, lo que permite potencialmente la obtención de este antígeno para la producción de vacunas contra el SAR-CoV-2 y la obtención de pruebas serológicas con fines de diagnósticos.

Producción de proteínas recombinantes para otros usos industriales

Pichia pastoris se ha utilizado para la producción de enzimas líticas en las industrias de pulpa y papel, textiles, detergentes, agroalimentos y productos químicos. Algunos ejemplos se presentan en la Tabla 2. *Pichia pastoris* también se ha utilizado para la producción de otros compuestos, como proteínas anticongelantes, gelatina humana o inhibidor de la proteasa catépsina K humana.⁽³⁾

Existe aún espacio para la optimización de la expresión de proteína y los sistemas de secreción, en dependencia del producto que se desee obtener. Debe ser objeto de atención, encontrar alternativas de inducción que reemplacen el metanol en las fermentaciones a escala industrial.⁽⁴⁴⁾

Aplicaciones de *Pichia pastoris* en la producción de vacunas en Cuba

Producción de la vacuna cubana antihepatitis B recombinante

La vacuna cubana antihepatitis B recombinante se produce empleando una cepa recombinante de la levadura *Pichia pastoris*. El gen del antígeno de superficie (HBsAg) se encuentra bajo la señal del promotor AOX1 de esta levadura, el cual se induce ante la presencia de metanol, empleando como marcador de selección HIS3 y como terminador de la transcripción el de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa procedente de

Tabla 2. Enzimas recombinantes producidas utilizando *Pichia pastoris*.

Enzima	Origen	Promotor	Rendimiento
Lipasa Lip2p	<i>Yarrowia lipolytica</i>	pAOX1	630 mgL-1
α -Amilasa	<i>Thermobifida fusca</i>	pGAP	510 UL-1
Fosfatasa alcalina	<i>Placenta humana</i>	pAOX1	2 mgL-1
Lacasa	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	pAOX1	28 mgL-1
Endo- β -1,4-xilanasa	<i>Aspergillus niger</i>	pAOX1	60 mgL-1
Endo- β -1,4-glucanasa	<i>Volvariella volvacea</i>	pAOX1	65 mgL-1
SK-57 fitasa	<i>Aspergillus niger</i>	pAOX1	865 UmL-1

Saccharomyces cerevisiae. En este caso la construcción empleada está integrada a un cromosoma de esta levadura mediante un doble entrecruzamiento, lo que le confiere una alta estabilidad.⁽⁴⁵⁾

Con esta vacuna, se implementó desde el año 1992 la vacunación nacional antihepatitis B dentro de las primeras 24 horas después del nacimiento, como parte de la estrategia de vacunación contra la hepatitis B. La incidencia en Cuba de la enfermedad en niños menores de 5 y 15 años disminuyó drásticamente a partir del inicio de las campañas de vacunación, desde 376 casos en 1991 a 16 en el 2012, para una tasa de incidencia de 0,1 por 100.000 habitantes, llegando a cero en la población menor de 15 años.⁽⁴⁶⁾

Producción de la vacuna Gavac® en Cuba

Gavac® es una vacuna basada en la glicoproteína Bm86, aislada de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y expresada en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.⁽⁴⁷⁾

La implementación del programa integrado para el control de la garrapata usando la vacuna Gavac® y el tratamiento acaricida demostró ser eficiente tanto desde el punto de vista veterinario como económico, permitiendo disminuir la contaminación ambiental, disminuir los costos de control y establecer estabilidad enzoótica.⁽⁴⁸⁾

El uso de la vacuna cubana combinada con tratamientos ascaridas en 18 estados de Venezuela permitió reducir el uso de ascaricidas químicos en un 83,7% y un ahorro de 81,5% del costo estimado de la aplicación del tratamiento tradicional.⁽⁴⁹⁾

No obstante, se trabaja en la caracterización de una vacuna conjugada entre un péptido de 20 aminoácidos de la proteína ribosomal P0 de la garrapata y Bm86 con una eficacia estimada del 90%.⁽⁵⁰⁾

Conclusión

En el trabajo se realizó un análisis de los factores que afectan la producción de proteínas recombinantes expresadas en *Pichia pastoris*, entre los que se encuentran la cepa hospedera, el sistema de expresión, así como la composición del medio de cultivo y los parámetros de operación recomendados para alcanzar altos valores de productividad.

El desarrollo de cada producto requerirá un estudio de las características particulares de las moléculas recombinantes y de las cepas productoras.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

José García Suárez, realizó la conceptualización de la investigación, participó en el análisis de la información y la escritura del trabajo.

Lourdes Zumalacárregui de Cárdenas, realizó la conceptualización de la investigación, participó en el análisis de la información y la escritura del trabajo.

Zeila Santana Vázquez, participó en el análisis de la información.

Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

Referencias

1. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*.2000;16(1):23-52.
2. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014; 98(12):5301-17. doi: <https://10.1007/s00253-014-5732-5>.
3. Fickers P. *Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production. *Curr Res Microbiol Biotechnol*. 2014;2(3):354-63.
4. Huang J, Xia J, Yang Z, Guan F, Cui D, Guan G, et al. Improved production of a recombinant *Rhizomucor miehei* lipase expressed in *Pichia pastoris* and its application for conversion of microalgae oil to biodiesel. *Biotechnol Biofuels*. 2014; 7:111-23. doi: <https://10.1186/1754-6834-7-111>.
5. Mohandesi N, Siadat S, Haghbeen K, Hesampour A. Cloning and expression of *Saccharomyces cerevisiae* SUC2 gene in yeast platform and characterization of recombinant enzyme biochemical properties. *3 Biotech*. 2016; 6(2):129. doi:<https://10.1007/s13205-016-0441-7>.
6. Pillaca-Pullo O, Feitosa V, Soares I, Pessoa-Jr A. Estudio del pH y la concentración de glicerol para la producción de antígeno recombinante de *Plasmodium vivax* usando *Pichia pastoris*. *Revista ECI Perú*. 2015; 11(2):19-23. Disponible en: <http://www.reddeperuanos.com/revista/eci2015vrevista/03biologiapiillacaplenariacopia.pdf>.
7. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*.2000;24:45-66.
8. Poutou-Piñales R, Córdoba-Ruiz HA, Barrera-Avellaneda L, Delgado-Boada J. Carbon source feeding strategies for recombinant protein expression in *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*. *Afr J Biotechnol*.2010; 9(15):2173-84.
9. Li H, Zhang T, Li J, Li H, Xua Y, Yu J. Expression of Zea mays transglutaminase in *Pichia pastoris* under different promoters and

- its impact on properties of acidified milk protein concentrate gel. *J Sci Food Agric.* 2019;99: 4518-23. doi: <https://10.1002/jsfa.9688>.
10. Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Tomomitsu K. Addition of oleic acid increases expression of recombinant human serum albumin by the AOX2 promoter in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng.* 2000; 89(5): 479-84.
 11. Garrigós-Martínez J, Vuoristo K, Nieto-Taype M, Tähtiharju J, Uusitalo J, Tukiainen P, et al. Bioprocess performance analysis of novel methanol-independent promoters for recombinant protein production with *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact.* 2021;20:74-86. doi: <https://10.1186/s12934-021-01564>.
 12. Vogl T, Fischer J, Hayden P, Wasmayer R, Stumberger L, Glieder A. Orthologous promoters from related methylotrophic yeasts surpass expression of endogenous promoters of *Pichia pastoris*. *AMB Expr.* 2020;10:38-46. doi: <https://10.1186/s13568-020-00972-1>.
 13. Li P, Anukanth A, Gao XG, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüneş N, et al. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2007;142(2):105–24.
 14. Higgins DR, Busser K, Comiskey J, Whittier PS, Purcell TJ, Hoeffler JP. Small Vectors for Expression Based on Dominant Drug Resistance with Direct Multicopy Selection. In: Higgins DR, Cregg JM (eds). *Pichia Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 103. New Jersey: Humana Press; 1998.p. 41-53.
 15. Drocourt D, Calmels T, Reynes JP, Baron M, Tiraby G. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(13):4009.
 16. Kimura M, Takatsuki A, Yamaguchi I. Blastocidin S deaminase gene from *Aspergillus terreus* (BSD): a new drug resistance gene for transfection of mammalian cells. *Biochim Biophys.* 1994;1219(3): 653-9.
 17. Scorer C, Clare J, McCombie W, Romanos MA, Sreekrishna K. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Nat Biotechnol.* 1994;12:181-4.
 18. Sunga AJ, Cregg JM. The *Pichia pastoris* formaldehyde dehydrogenase gene (FLD1) as a marker for selection of multicopy expression strains of *P. pastoris*. *Gene.* 2004;330:39–47.
 19. Kottmeier K, Ostermann K, Bley T, Rödel G. Hydrophobin signal sequence mediates efficient secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 91(1):133-41.
 20. Liang S, Li C, Ye Y, Lin Y. Endogenous signal peptides efficiently mediate the secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett.* 2013; 35(1):97-105.
 21. De Pourcq K, De Schutter K, Callewaert N. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 87:1617-31.
 22. Yang J, Jiang W, Yang S. mazF as a counterselectable marker for unmarked genetic modification of *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* 2009; 9(4):600-9.
 23. Pan R, Zhang J, Shen WL, Tao ZQ, Li SP, Yan X. Sequential deletion of *Pichia pastoris* genes by a self-excisable cassette. *FEMS Yeast Res.* 2011;11(3):292-8.
 24. Li S, Sing S, Wang Z. Improved expression of *Rhizopus oryzae* α -amylase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2011; 79(1): 142-8.
 25. Jacobs P, Geysens S, Verwecken W, Contreras R, Nico Callewaert N. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat Protoc.* 2009; 4(1):58-70.
 26. Beck A, Cochet O, Wurch T. GlycoFi's technology to control the glycosylation of recombinant therapeutic proteins. *Expert Opin Drug Discov.* 2010; 5(1):95-111.
 27. Li H, Sethuraman N, Stadheim T, Zha D, Prinz B, Ballew N, et al. Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol.* 2006; 24(2):210-5.
 28. Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(4):329-32.
 29. Julien C. Production of Humanlike Recombinant Proteins in *Pichia pastoris* from Expression Vector to Fermentation Strategy. *BioProcess Int.* 2006;4(1):22-31.
 30. Argentinian AntiCovid Consortium. Structural and functional comparison of SARS-CoV-2-spike receptor binding domain produced in *Pichia pastoris* and mammalian cells. *Sci Rep.* 2020; 10(1):21779. doi: <https://10.1038/s41598-020-78711-6>.
 31. Invitrogen. *Pichia* fermentation process guidelines. Massachusetts: Invitrogen;2000.
 32. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 2005;22: 249-70.
 33. Celik E, Calik P, Oliver S. Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. *Yeast.* 2009; 26(9):473-84.
 34. Cos O, Ramón R, Montesinos J, Valero F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microb Cell Fact.* 2006; 5:17.
 35. D'Anjou M, Daugulis A. Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. *Biotechnol Lett.* 2000; 22(5):341-6.
 36. Jorda J, Jouhten P, Camara H, Maaheimo H, Joan Albiol J, Ferrer P. Metabolic flux profiling of recombinant protein secreting *Pichia pastoris* growing on glucose: methanol mixtures. *Microb Cell Fact.* 2012;11:57.
 37. Katla S, Pavan SS, Mohan N, Sivaprakasam S. Biocalorimetric monitoring of glycoengineered *P. pastoris* cultivation for the production of recombinant hIFN α 2b: A quantitative study based on mixed feeding strategies. *Biotechnol Prog.* 2020; 36(3):e2971. doi: <https://10.1002/btpr.2971>.
 38. Celik E, Calik P, Oliver S. Metabolic flux analysis for recombinant protein production by *Pichia pastoris* using dual carbon sources: Effects of methanol feeding rate. *Biotechnol Bioeng.* 2010; 105(2): 317-29.

39. Dragosits M, Stadlmann J, Albiol J, Baumann K, Maurer M, Gasser B et al. The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *J Proteome Res.* 2009;8(3):1380-92. doi:<https://org/10.1021/pr8007623>.
40. Niu H, Jost L, Pirlot N, Sassi H, Daukandt M, Rodriguez C, et al. A quantitative study of methanol/sorbitol co-feeding process of a *Pichia pastoris* Mut⁺/pAOX1-lacZ strain. *Microb Cell Fact.* 2013; 12:33. doi:<https://10.1186/1475-2859-12-33>.
41. Berrios J, Flores MO, Díaz-Barrera A, Altamirano C, Martínez I, Cabrera Z. A comparative study of glycerol and sorbitol as co-substrates in methanol-induced cultures of *Pichia pastoris*: temperature effect and scale-up simulation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2017; 44(3):407-11. doi:<https://10.1007/s10295-016-1895-7>.
42. Ye J, Ly J, Watts K, Hsu A, Walker A, McLaughlin K, et al. Optimization of a glycoengineered *Pichia pastoris* cultivation process for commercial antibody production. *Biotechnol Prog.* 2011; 27:1744-50. doi:<https://10.1002/btpr.695>.
43. Tomé-Amat J, Fleischer L, Parker SA, Bardliving CL, Batt CA. Secreted production of assembled Norovirus virus-like particles from *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact.* 2014;13:134-42. doi:<https://10.1186/s12934-014-0134-z>.
44. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98:5301-17. doi:<https://10.1007/s00253-014-5732-5>.
45. Hardy E, Martínez E, Diago D, Díaz R, González D, Herrera L. Large-scale Production of recombinant Hepatitis B Surface Antigen from *Pichia pastoris*. *J Biotechnol.* 2000; 77(2-3):157-67.
46. Organización Panamericana de la Salud. Experiencia cubana en la producción local de medicamentos, transferencia de tecnologías y mejoramiento en el acceso a la salud. 2da. ed. García-Delgado BM, Uramis-Díaz E, Fajardo ME (eds). La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2019. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53037>.
47. Vargas-Hernández M, Santana-Rodríguez E, Montero-Espinosa C, Sordo-Puga Y, Acosta-Hernández A, Fuentes-Rodríguez Y, et al. Estabilidad, seguridad e inmunidad protectora de la vacuna Gavac[®] sometida a estrés térmico. *Biotechnol Apl.* 2018.35(1):1221-7. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522018000100003.
48. de la Fuente J, Almanzán C, Canales M, Pérez de la Lastra J, Kocan K, Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res Rev.* 2007;8(1): 23-8.
49. Suárez M, Rubi J, Pérez D, Córdova V, Salazar Y, Vielma A, et al. High impact and effectiveness of Gavac[™] vaccine in the national program for control of bovine ticks *Rhipicephalus microplus* in Venezuela. *Livest Sci.* 2016;187:8-52. doi:<https://10.1016/j.livsci.2016.02.005>.
50. Obregón-Alvarez D, Corona-González B, Rodríguez-Mallón A, Rodríguez-González I, Alfonso P, Noda-Ramos AA. Ticks and Tick-Borne Diseases in Cuba, Half a Century of Scientific Research. *Pathogens.* 2020; 9(8):616. doi: <https://10.3390/pathogens9080616>.

Uses of *Pichia pastoris* yeast in the production of recombinant proteins

Abstract

Pichia pastoris methylotrophic yeast (currently classified as *Komagataella phaffii*) is one of the most important yeast for the production of heterologous proteins. The work presents an analysis of the main characteristics that are marked in the production of recombinant proteins expressed in *Pichia pastoris*. It describes the strains available for the transformation and production of recombinant proteins expressed in *P. pastoris*, the main commercial vectors for expression, the most efficient promoters, selectable markers, the secretion signal, the methods used in genetic transformations and glycosylation patterns that occur. General recommendations are provided on bioprocess parameters such as media composition, pH, temperature, aeration velocity, induction, and feeding strategies to achieve high productivity values. The results of *Pichia pastoris* applications for the production of two vaccines in Cuba, the hepatitis B vaccine and the tick control vaccine are shown.

Keywords: vaccines; recombinant proteins, yeasts; protein engineering.
