(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 278 681**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/67 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C12Q 3/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **01270616 .4**
(86) Fecha de presentación : **16.11.2001**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1349945**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2003**

(54) Título: **Procedimiento para la producción de una proteína heteróloga por un hongo.**

(30) Prioridad: **13.12.2000 EP 00311095**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **16.08.2007**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **16.08.2007**

(73) Titular/es: **UNILEVER N.V.**
Weena 455
3013 AL Rotterdam, NL

(72) Inventor/es: **Van de Laar, Antonius M. J;**
Lindner, Nigel M. y
Nieuwpoort, Peter

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 278 681 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de una proteína heteróloga por un hongo.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de una proteína o péptido heterólogos en un hongo.

Antecedentes de la invención

Se conoce bien la producción de proteínas heterólogas en un huésped tal como un hongo. El documento EP-A-481.008 describe la producción de una proteína heteróloga en una levadura, que crece en glucosa.

La producción industrial, a gran escala de una proteína heteróloga por un organismo huésped en una fermentación discontinua alimentada muestra generalmente tres fases.

La primera fase es la fase discontinua que se define como la fase en la que las células crecen hasta la concentración requerida. En esta fase las células crecen de manera exponencial. Los modelos que describen la fase discontinua asumen que las células no mueren, que el oxígeno está presente en exceso, y que todas las otras condiciones son tales que el crecimiento puede ocurrir sin limitación. Esto implica que en la fase discontinua todos los requerimientos de nutrientes se suministran en cantidad suficiente. En resumen, la fase discontinua es la fase en la que las células se amplifican mientras que la producción de la proteína (heteróloga) es todavía baja.

La segunda fase es la fase de alimentación que se define como la fase en las que la fuente de carbono y otros requerimientos se suministran a un fermentador en una corriente líquida relativamente concentrada a una velocidad precalculada, la "velocidad de alimentación". En esta fase el énfasis es sobre la producción de proteína por las células crecidas y el crecimiento celular que conduce a un aumento de la biomasa. El sustrato que se suministra al fermentador se usa en esta etapa generalmente para el crecimiento celular y la síntesis del producto. El crecimiento celular se controla con la velocidad de alimentación para obtener un crecimiento celular y una producción de proteína heteróloga óptimos.

Finalmente, se alcanza la tercera fase, que se define como la fase de descenso, en la que surgen condiciones limitantes. En esta fase, por ejemplo, la concentración de oxígeno en el fermentador baja hasta cero, conduciendo en algunos casos a la formación de etanol. En esta etapa, la mayoría de las células se centrarán en el mantenimiento y normalmente se reduce la síntesis del producto. Aunque puede observarse todavía crecimiento celular en esta fase, el crecimiento está generalmente muy limitado a cero. Gradualmente, las células pueden perder viabilidad en esta fase.

La producción de proteína heteróloga en un medio que comprende una fuente de carbono común como glucosa y otra fuente de carbono basada en azúcar es satisfactoria hasta que comienzan a surgir condiciones limitantes al final de la fase de alimentación. Los ejemplos de condiciones limitantes incluyen concentración de oxígeno reducida, nutrientes como vitaminas, carbono, nitrógeno reducidos y acumulación de compuestos tóxicos en el medio de crecimiento.

Si se crece un hongo, especialmente una levadura, en un medio que comprende glucosa como fuente de carbono, tan pronto como surjan condiciones limitantes, la producción de proteína heteróloga se reduce considerablemente.

Para levaduras crecidas en un medio común que incluye un azúcar como fuente de carbono, las fases descritas anteriormente existen en una fermentación de alimentación discontinua. Por lo tanto, una vez que ha comenzado la fase de descenso, la producción específica, que se define como la cantidad de proteína o péptido heterólogo producidos por gramo de biomasa, se mantiene o se reduce. Incluso aunque la densidad celular sea alta, la síntesis de producto baja por lo tanto en la fase de descenso.

Otra desventaja del medio común que a menudo comprende glucosa como fuente de carbono, es la alta cantidad de sustrato que se convierte en biomasa en lugar de conversión en producto, que normalmente es una proteína heteróloga en el contexto de esta invención. Por lo tanto, en tales sistemas, una cantidad relativamente alta de biomasa acompaña de forma inevitable a la producción de niveles altos de proteína heteróloga.

Esta biomasa alta conduce a un medio de fermentación viscoso en el que por ejemplo surge fácilmente la limitación de oxígeno.

Por lo tanto, existe un deseo por un procedimiento para la producción de proteínas heterólogas en un huésped como un hongo que conduzca a rendimientos altos de proteína heteróloga incluso en condiciones limitantes, donde normalmente existiría descenso y producción específica reducida, mientras que al mismo tiempo la producción específica del sistema de crecimiento se mantenga o aumente comparada con los sistemas de crecimiento conocidos.

El procedimiento de la presente invención supera al menos uno de los problemas indicados.

Sumario de la invención

Se ha descubierto de forma sorprendente que hongos crecidos en un medio que comprende etanol como fuente de carbono principal y un inductor como galactosa para controlar la producción de una proteína heteróloga, muestran una producción específica alta de proteína heteróloga, mientras que la producción específica de la proteína heteróloga es sorprendentemente alta incluso en condiciones limitantes.

Sorprendentemente, los hongos crecidos de acuerdo con este procedimiento no muestran las características bien conocidas de descenso que se encuentran en hongos crecidos en los medios tradicionales basados en glucosa. Continuando la alimentación con el medio que comprende esta fuente de carbono específica, los hongos mantienen o incluso aumentan el nivel absoluto y específico de producción de proteína heteróloga.

Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de una proteína heteróloga por un hongo que comprende el crecimiento de dicho hongo en un medio que comprende una fuente de carbono en el que el 50-100% en peso de dicha fuente de carbono es etanol, y donde el medio comprende adicionalmente un inductor.

Descripción detallada de la invención

En el contexto de la invención, el término hongo abarca levaduras y mohos.

Para el propósito de la invención, la expresión proteína heteróloga se supone que incluye tanto proteínas como péptidos.

Una proteína heteróloga es una proteína que no la produce de forma natural el hongo sino sólo después de que el hongo se haya modificado en este grado.

Cuando se indiquen porcentajes en peso, estos son porcentajes en peso sobre el producto total o el peso total del medio, a menos que se indique lo contrario.

Cuando se use la expresión concentración de oxígeno, se hace referencia a la concentración de oxígeno disuelto que se mide con el procedimiento ilustrado en los ejemplos.

El final de la fase discontinua se define como el momento en que todo el sustrato de carbono proporcionado a las células se ha consumido.

La fase de inducción se define como la fase que comienza después de la fase discontinua desde el momento en que comienza la inducción de proteína heteróloga hasta el momento en que se obtiene la inducción máxima para la concentración de inductor específico usado.

La fuente de carbono se define como el sustrato que proporciona el suministro de carbono y energía a la célula. Los hongos obtienen su carbono celular predominantemente a partir de compuestos orgánicos. Estos sirven comúnmente tanto como fuente de carbono como fuente de energía: se asimilan parcialmente en el material celular y se oxidan parcialmente para proporcionar energía. En este contexto, se hace referencia a H. Schlegel en el documento General microbiology, Cambridge University press, 1992, 7ª edición, página 194.

La invención se refiere a un procedimiento para la producción de una proteína heteróloga por un hongo. Para producir esta proteína, el hongo se modifica genéticamente de forma que sea posible la producción controlada de esta proteína o péptido heterólogos.

Puede usarse cualquier procedimiento de construcción o transformación adecuado para esta modificación genética. Los ejemplos de procedimientos de construcción y transformación adecuados se dan en el documento EP-A-481.008 que se incorpora en la presente como referencia.

En general, el hongo modificado comprenderá después de la modificación un vector (integrado) que comprende el gen que codifica la proteína heteróloga, bajo el control de un promotor. La actividad del promotor se regula con un así llamado inductor. Los ejemplos de promotores incluyen los promotores de galactosa como *GAL4, GAL7* que son inducidos por galactosa; promotores inducidos por metanol, inducidos por metanol; promotores de etanol, inducidos por etanol; promotores regulados por la temperatura, inducidos por un cambio de temperatura; promotores regulados por fosfato, inducidos por la presencia de fosfato; y promotores represibles de glucosa, inducidos por la ausencia de glucosa.

El hongo se crece en un medio que comprende una fuente de carbono de la cual del 50 al 100% en peso es etanol, en combinación con la presencia de un inductor en el medio.

En la técnica, el uso de etanol como fuente de carbono se rechaza generalmente como se ejemplifica por la descripción citada a continuación. En resumen, se ha comunicado que el uso de etanol en lugar de glucosa como fuente de carbono reduce el rendimiento de biomasa, al requerir un consumo de oxígeno más alto y no proporcionar por lo tanto crecimiento o crecimiento limitado en condiciones limitantes de oxígeno. Además, la toxicidad al etanol de las cepas

puede conducir a pérdidas en la viabilidad y muerte celular. Esto se describe por ejemplo en la tabla 1 del documento The yeasts, vol 3, 2ª ed., capítulo 6. Se hace referencia especial al apéndice 1 de esta descripción que describe que para levaduras, la velocidad de crecimiento en etanol es 0,1 h^{-1} frente 0,35 h^{-1} en glucosa. Este apéndice describe además que en un medio con etanol como sustrato de carbono, las levaduras muestran un consumo de oxígeno más alto que en un medio que comprenda glucosa como sustrato de carbono.

El crecimiento de células en etanol como fuente de carbono lo describen además Shiba y col (J. of bioscience and bioengineering, vol 89, páginas 426-430, 2000). Shiba describe la expresión de carboxipeptidasa Y (CPY) usando el promotor de *GAL10* en un mutante gal80 de *Saccharomyces cerevisiase*. El medio de crecimiento comprende etanol como única fuente de carbono. Tras el comienzo del suministro de etanol, se ha comunicado que tanto la velocidad de crecimiento como la producción de CPY descienden. Este sistema no está bajo el control de un inductor.

La presente invención proporciona un proceso en el que la producción de proteínas se mantiene o incluso aumenta en presencia de un medio que comprende una fuente de carbono de la cual del 50 al 100% es etanol, especialmente cuando surgen condiciones de crecimiento limitantes. Además, el procedimiento de acuerdo con la invención es aplicable para cualquier tipo de hongo y no requiere mutantes gal80 específicos para el crecimiento. El procedimiento de la invención es también controlable por medio de inducción.

Saliola, M y col (applied and environmental microbiology, Enero 1999, p. 53-60) describen el uso del promotor K1ADH4 inducible por etanol para la expresión génica heteróloga en *Kluyveromyces lactis*. Este documento muestra que la expresión es óptima cuando se usa etanol como promotor y de manera simultánea como fuente de carbono única en un sistema de alimentación discontinua. Este sistema de producción no posibilita el control de la expresión génica en la fase de alimentación.

Jin, S y col (Journal of Biotechnology, vol 54, páginas 161-174, 1997) describe el crecimiento de *S. cerevisiae* recombinante en mezclas de galactosa y etanol.

Un beneficio adicional del procedimiento de acuerdo con la invención, es el control de la producción de calor que es importante para la producción de proteínas lábiles al calor.

Se prefiere que el medio comprenda una fuente de carbono de la cual del 50 al 100% en peso sea etanol, en combinación con la presencia de un inductor en el medio, durante todas las fases, pero se descubrió que es posible usar un medio que no satisfaga estos requerimientos en la fase discontinua, con tal de que el medio de la fase de alimentación satisfaga los requerimientos.

En una realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de una proteína heteróloga por un hongo, comprendiendo el procedimiento una fase discontinua y una fase de alimentación y en el que el medio de la fase de alimentación comprende una fuente de carbono de la cual del 50 al 100% en peso es etanol y en el que el medio de la fase de alimentación comprende adicionalmente un inductor.

Comparado con los sistemas de crecimiento conocidos, que normalmente contienen glucosa y otro azúcar como fuente de carbono principal, el medio de acuerdo con la invención posibilita niveles de producción específica altos incluso en condiciones limitantes; es decir, no existe preferiblemente fase de descenso.

Se descubrió incluso que la producción específica más alta estaba en la fase de alimentación en condiciones de oxígeno limitantes, mientras que para sistemas de crecimiento basados en glucosa, la producción específica más alta se encuentra normalmente en la fase de alimentación, donde la cantidad de biomasa es todavía relativamente baja.

Sin desear estar limitados por ninguna teoría, los solicitantes creen que la fase de descenso se prolonga o incluso está ausente debido al uso de un medio que comprende una fuente de carbono de la cual del 50 al 100% en peso es etanol, en el procedimiento de la invención.

En el procedimiento para producir una proteína heteróloga, las condiciones de alimentación preferiblemente se optimizan de forma que la velocidad de crecimiento celular y la producción de proteína heteróloga sean óptimas.

Como se ha indicado anteriormente, si el hongo se crece a escala industrial, se prefiere en gran medida un sistema de alimentación discontinua usando un fermentador.

En otra realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de una proteína heteróloga por un hongo comprendiendo el procedimiento una fase discontinua, una fase de inducción y una fase de alimentación en el que en dicha fase de alimentación

a) las células fúngicas se crecen a una densidad celular de al menos 5 g/l en un medio que comprende cualquier fuente de carbono, sin preferencia específica, y posteriormente las células fúngicas se crecen a una densidad celular de más de 5 g/l, preferiblemente de 10 a 90 g/l, más preferido de 40 a 60 g/l, usando un medio que comprende un inductor y una fuente de carbono en la que del 50 al 100% en peso de dicha fuente de carbono es etanol

b) después de que se haya obtenido la densidad celular de la etapa (a), se crean condiciones de crecimiento limitantes,

c) después de que se hayan establecido estas condiciones limitantes, las células se crecen adicionalmente en un medio que comprende una fuente de carbono en la que del 50 al 100% de dicha fuente de carbono es etanol.

En este procedimiento preferido, las células se crecen en una primera etapa en una fase discontinúa hasta que se haya consumido el sustrato de carbono, y en una segunda etapa las células se crecen a una densidad celular suficiente para posibilitar la producción de proteína heteróloga en altas cantidades. En las primeras etapas de esta segunda fase, se induce la producción de proteína heteróloga por adición de un inductor al medio de alimentación. El tiempo que lleva llegar desde inducción cero, y de ese modo un nivel muy bajo de producción de proteína heteróloga, hasta que la inducción es máxima, se llama fase de inducción. Esta fase de inducción constituye la primera etapa de la fase de alimentación.

Pueden obtenerse condiciones limitantes en un fermentador de varias formas. Las condiciones limitantes se definen como las condiciones en las que ya no es posible el crecimiento celular exponencial y disminuye el crecimiento celular.

Preferiblemente, en el procedimiento de la invención, se crean las condiciones limitantes en un medio por un procedimiento seleccionado entre el grupo constituido por

a) reducción de la concentración de oxígeno en el medio del fermentador, preferiblemente por debajo del 30%, más preferido por debajo del 15%,

b) sobrealimentar el medio con etanol hasta que el nivel de etanol en el medio esté a la concentración limitante del crecimiento o por encima para las células de la cepa que crece en el medio,

c) disminuir el nivel de otros ingredientes esenciales para el crecimiento de las células, estando dichos ingredientes preferiblemente seleccionados entre nitrógeno, fósforo, azufre y vitaminas.

Preferiblemente, después de la fase discontinua, el perfil de alimentación aumenta exponencialmente con la producción de biomasa. Cuando surgen limitaciones de oxígeno y se entra en la fase de descenso, la velocidad de alimentación se ajusta preferiblemente a una velocidad como para mantener una concentración de etanol de por debajo del 10% en volumen en el medio del fermentador. Esto puede obtenerse por ejemplo con una velocidad de alimentación lineal o una velocidad de alimentación pulsada o una velocidad de alimentación por etapas.

En una realización incluso más preferida, el procedimiento de la invención se realiza como un procedimiento discontinuo de alimentación repetida.

Preferiblemente, el inductor es adecuado para activar el promotor, que está conectado de manera funcional con el gen heterólogo en la construcción génica usada para la transformación del hongo huésped. Son inductores preferidos la galactosa, el metanol, la temperatura y los fosfatos.

El inductor más preferido en la galactosa.

La presente invención no se refiere a procedimientos de expresión en los que se use etanol tanto como un inductor como una fuente de carbono (parte de ella).

Cuando el inductor es galactosa, la cantidad de galactosa en el medio debe ser preferiblemente tal que el promotor se active en el nivel deseado mientras que la cantidad sea tan baja, que no se metaboliza la galactosa. Para impedir esto, es posible usar una cepa que sea incapaz de metabolizar el inductor.

Preferiblemente, la composición del medio de alimentación es tal que el medio del fermentador comprende del 0,1 al 10% en peso de galactosa, más preferido del 0,05 al 1% en peso, incluso más preferido del 0,05 al 0,2% en peso de galactosa.

La fuente de carbono en el medio de acuerdo con la invención comprende al menos del 50% en peso y hasta el 100% en peso de etanol. Preferiblemente, la fuente de carbono comprende del 80 al 100% de etanol. La fuente de carbono restante puede ser por ejemplo un azúcar tal como glucosa, galactosa, lactosa, sacarosa, fructosa u otro compuesto como glicerol, acetato o sustratos de carbono complejos como suero de leche y melaza.

El hongo puede ser una levadura o un moho. Los ejemplos de géneros de levaduras adecuados incluyen *Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Hansenula*. Los ejemplos de mohos adecuados incluyen *Aspergillus, Rhizopus, Trichoderma*.

El organismo especialmente preferido es *Saccharomuyes cerevisiae*.

La proteína heteróloga puede ser cualquier proteína o péptido del cual se desee su producción. Se descubrió que el procedimiento de acuerdo con la invención era especialmente adecuado para la producción de péptidos anticongelantes, anticuerpos o fragmentos de los mismos, o enzimas tales como cutinasa y galactosidasa.

Los péptidos anticongelantes son proteínas que tienen la capacidad de modificar el crecimiento del hielo, y se describen por ejemplo en el documento biotechnology advances vol. 13, nº 3, pp 375-402, 1995 de Griffith y col., que se incorpora en la presente como referencia.

El medio para las diversas fases del crecimiento del hongo comprende generalmente una fuente de carbono, opcionalmente un inductor, cuya presencia se requiere después de la fase discontinua, y opcionalmente ingredientes adicionales tales como vitaminas, extractos de levaduras, iones de metales traza, agentes acidificantes para mantener el pH a un nivel deseado, sales de fosfato, sales de sulfato, agua y agentes antiespumantes.

De acuerdo con otra realización preferida la invención se refiere a un procedimiento para producir una proteína o péptido heterólogos en el que el medio discontinuo comprende del 1 al 40% en peso de glucosa, agua, metales traza, opcionalmente un agente antiespumante, extracto de levaduras, vitaminas, sales de fosfato y sales de sulfato y en el que el medio de crecimiento comprende del 5 al 35% en peso de etanol, el 0,1-10% en peso de galactosa, agua, metales traza, y opcionalmente un agente antiespumante, extracto de levadura, vitaminas, sales de fosfato y sales de sulfato y en el que la "velocidad de alimentación" "φ" es de 0,25 a 4 g/min en una escala de 10 litros o un valor correspondiente para una fermentación a mayor escala.

La invención se refiere además a una proteína heteróloga aislada, especialmente un péptido anticongelante aislado, obtenido por el procedimiento de acuerdo con la invención.

La invención se ilustrará ahora con los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Medios y cultivos

Todos los datos de medios y cultivos se basan en una fermentación de etanol a una escala de 10 litros.

Para una escala de 10 m^3 es aproximadamente lo mismo adaptado a un factor de escala de 1000.

Medios

Medios de precultivo

MEDIO DE INÓCULO	Compuesto	g/l	Suministrador
YNB Base de nitrógeno de levaduras	YNB sin aminoácidos	6,7	Difco
	Glucosa * 1 ac	5	AVEBE
	En agua desmineralizada		
YPD Dextrosa de peptona de levaduras	YE	10	Difco
	bacto peptona	20	Difco
	Glucosa * 1 ac	20	AVEBE
	En agua desmineralizada		

Los medios discontinuos y de alimentación se enumeran en la tabla 1 para una escala de 10 litros.

TABLA 1

Compuesto	Suministrador	Concentración (g/kg)		
		Discontinuo	Alimentación de etanol	Ejemplo comp. de alimentación de glucosa
Glucosa	Avebe	22,0	-	440,0
Agua corriente				
EtOH*	Lamers & Pleuger	-	333,84	-
Agua corriente				
Galactosa	HMS	-	3,0	3,0
Agua corriente				
YE Kat G	Ohly	10,0	25,0	25,0
KH_2PO_4	Acros	2,1	12,0	12,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Merck	0,6	2,5	2,5
Vitaminas Egli	Véase la Tabla 2	1,0	2,0	2,0
Metales traza Egli	Véase la Tabla 2	10,0	20,0	20,0
Structol J 673	Schill & Seilacher	0,4	0,8	0,8
Agua corriente				
Peso total (g)		5.500	4.000	4.000

* Etanol puro, contenido del 96,2% en volumen, no desnaturalizado

Todos los medios se esterilizaron 25 minutos a 121ºC/1,2 bares (autoclave Linden), los azúcares de forma separada. Las cantidades de agua corriente se describen a continuación y la cantidad total es tal que el peso total es como se ha indicado en la fila inferior de la tabla 1.

TABLA 2

Composición de vitaminas Egli y metales traza

Vitaminas Egli (solución madre 1000x)		Metales traza Egli (solución madre 100x)	
Compuesto	g/l	Compuesto	g/l
Tiamina (HCl)	5,00	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	5,50
Meso-inosit	47,00	$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	3,73
Piridoxina	1,20	$MnSO_4 \cdot 1\ H_2O$	1,40
Pantoténico	23,00	$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1,35
Biotina	0,05	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,40
		$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,45

Las vitaminas se esterilizaron con un filtro de 0,22 μm.

Cepas

La cepa usada fue *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK102-3A. La cepa de *S. cerevisiae CEN.PK2* básica está disponible en el mercado a partir de EUROSCARF, Institute for Microbiology, Universidad Johann Wolfgang Goethe Frankfurt, calle Marie-Curie 9; edificio N250, D-60439 Frankfurt, Alemania.

Esta cepa de *S. cerevisiae* no es capaz de metabolizar galactosa ya que el gen *GAL1* se ha interrumpido por inserción de secuencias derivadas del gen *URA3* de *S. cerevisiae*. La cepa huésped se transformó con un plásmido de expresión que comprendía los siguientes elementos:

Promotor: promotor *GAL7*, conductor *GAPDH*. Promotor *GAL7*: están presentes siempre dos secuencias activantes cadena arriba. Son dos elementos naturales que son parte de la secuencia tal como están unidos.

Marcador de selección: *Leu2d*

Secuencia señal: invertasa (*SUC2*)

Diana de integración: fragmento de ADNr repetido con un sitio de restricción exclusivo para fijar como objetivo la integración en una región específica en el cromosoma XII de levaduras.

Gen heterólogo

Ejemplo 1: un gen de una proteína anticongelante que codifica la proteína anticongelante HPLC12 de la babosa vivípara americana (*Macrozoarces americanus*) (documento WO-A-9702343).

Ejemplo 2: K609B, un anticuerpo contra factores de virulencia en lechones.

Ejemplo 3: Proteína VHH G que es HGL11, que es una cadena pesada de inmunoglobulina; el inhibidor de la lipasa contra la lipasa gástrica humana descrito en el documento EP-A-1.134.231.

Ejemplo 4: Proteína VHH P que es HPL18, que es una cadena pesada de inmunoglobulina; el inhibidor de la lipasa contra la lipasa del páncreas humana descrito en el documento EP-A-1.134.231.

Las proteínas de los ejemplos 2-4 son anticuerpos obtenidos por inmunización de una llama de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento EP-A-1.134.231.

Cultivos

Almacenamiento de las cepas

Las cepas se almacenaron a -80ºC en un lote único a partir de cultivos crecidos en YNB diluidos 1:1 con una mezcla de leche desnatada y glicerol al 20%.

Inoculación

Se inocularon 50 ml de YNB con 1 ml de la cepa almacenada, y se incubaron durante 48 horas ± 2 horas a 30ºC a 150 r.p.m.

Posteriormente, el inóculo se transfirió a 500 ml de YPD al 2%, seguido por incubación durante 24 horas ± 2 horas a 30ºC a 150 r.p.m.

Fermentador

Las fermentaciones se realizaron en fermentadores convencionales con un volumen de trabajo de diez litros. Para el control de la temperatura, el fermentador se equipó con un serpentín de refrigeración y un dedo de calentamiento. Los tabiques deflectores eran de dimensiones convencionales. Se usó un impulsor tipo Rushton con seis palas para agitar. El oxígeno disuelto (DO_2) se midió con un electrodo de DO_2 Ingold (Mettler-Toledo) y el pH se midió con un electrodo de gel Ingold Impro 3000 (Mettler-Toledo). Se usó un espectrofotómetro de masas Prima 600 (sistemas de análisis de gases VG) para medir el gas de salida. El procedimiento de fermentación completo se automatizó y se controló con programa informático pero podría realizarse también manualmente basándose en la guía proporcionada a continuación.

Se impuso un perfil de alimentación para controlar la fermentación. Se controló el pH usando ácido fosfórico 3M (Baker) y amoniaco al 12,5% en volumen (Merck).

Se controló el DO_2 al 30% por ajuste automático de la velocidad del impulsor hasta que se alcanzó la velocidad de agitación máxima (1000 rpm).

Durante la fermentación, se tomaron muestras de 5 ml con un automuestreador y se enfriaron a 4ºC para la determinación del peso seco y el análisis de la concentración de producto.

Fase discontinua

Para comenzar la fase discontinua, se añadieron 500 ml de inóculo YPD a 5,5 l de medio discontinuo. Los parámetros de fermentación estaban de acuerdo con la tabla 3,1. Cuando el contenido de etanol en el gas de salida disminuyó a 300 ppm, comenzó la alimentación exponencial.

Fase de alimentación

El medio de alimentación se separó en dos botellas de alimentación conectadas a la misma bomba. Una botella de alimentación contenía etanol y agua corriente hasta 2 litros y se suministró al fermentador a través de la placa inferior. La segunda botella de alimentación contenía todos los otros componentes de alimentación y agua hasta 2 litros y se suministró a través de la placa superior. A partir de ambas botellas, conectadas a una bomba, se aplicó la misma velocidad de alimentación exponencial de acuerdo con la ecuación 1. Para dos botellas la velocidad de alimentación resultante es dos veces la velocidad de la bomba.

$$\Phi_{v,t} = \frac{\mu * X_o * e^{\mu * 1}}{\rho_{alimentación} * Y_{x,s} * 60} \qquad [g/min] \qquad \text{(ecuación 1)}$$

$\Phi_{v,t}$ = velocidad de alimentación	g/min
μ = velocidad de crecimiento	h^{-1}
X_0 = biomasa al comienzo de la alimentación	g (Pm = 24,6 g/mol)
t = tiempo desde el comienzo de la alimentación	min
$\rho_{alimentación}$ = densidad de alimentación	g de etanol/g de alimentación
$Y_{X,S}$ = estim. del rendimiento de biomasa	g X/g de sustrato
60 = factor de tiempo	min/h

Los parámetros de alimentación estaban de acuerdo con la tabla 3.

TABLA 3

Parámetros de alimentación de la fermentación para fermentación de etanol de 10 litros

Parámetro	Valor
μ (1/h)	0,06
X_0 (mol)	1,06
$\rho_{alimentación}$ (g/g)	0,41
$Y_{X,S}$ (g/g)	0,45
T discontinua (ºC)	30
T de alimentación (ºC)	21
Flujo de aire discontinuo (l/min)	2
Flujo de aire de alimentación (l/min)	6
DO_2 (%)	30
DO_2 mínimo (%)	0
PH	5
SS min (rpm)	300
SS max (rpm)	1000
Criterio de EtOH de comienzo de la alimentación (ppm)	300
Criterio de EtOH de comienzo del descenso (ppm)	800
EtOh máximo (ppm)	2000
Velocidad de alimentación total inicial (g/min)	0,28 g/min
Velocidad de alimentación total lineal (g/min)	2 g/min

Cuando la concentración de oxígeno era del 0%, se establecieron las condiciones limitantes y la velocidad de la bomba se ajustó a una velocidad de alimentación lineal. Esta alimentación continuó hasta que se agotó todo el alimento.

Resultados

Ejemplo 1

Etanol como fuente de carbono			
Tiempo (h)	AFP (mg/kg de caldo de fermentación)	Materia seca (g/kg)	Producción específica* (mg/g)
0	0	2,4	0
3	0	3,4	0
6	0	5,7	0
9	0	7,6	0
12	0	10,9	0
15	0	10,5	0
18	0	11,7	0
21	0	13,3	0
24	0	15,6	0
27	7,0	17,9	0,393
30	11,4	20,7	0,549
33	17,9	24,8	0,721
36	24,2	28,8	0,840
39	32,4	32,7	0,990
42	41,8	38,4	1,089
45	52,4	42,7	1,227
48	66,9	49,0	1,366
51	78,7	55,0	1,432
54	93,7	60,6	1,546
57	112,2	64,8	1,732
60	132,1	68,6	1,925
63	151,2	71,9	2,104
66	165,8	75,5	2,195

* Producción específica: mg de AFP/g de materia seca

Sobre la base de estos resultados se concluye que la producción de AFP cuando en la fase de alimentación surgen después condiciones limitantes, continuando la alimentación con medio que contiene una fuente de carbono que es el 100% en peso etanol, conduce a una producción específica de AFP sorprendentemente alta.

Se observó que la producción de biomasa era constante sin pérdida de productividad de AFP absoluta.

Ejemplo comparativo

El medio de crecimiento en la fase de alimentación no contenía etanol sino glucosa al 100% en peso como fuente de carbono. El medio para este experimento se ha descrito anteriormente. También se han especificado anteriormente las condiciones de alimentación del fermentador con las siguientes excepciones:

El medio de alimentación se aplicó al fermentador desde una botella de alimentación, que contenía todos los componentes y se suministró al fermentador a través de la placa inferior. Se aplicó una velocidad de alimentación exponencial de acuerdo con la ecuación 1.

Los parámetros de alimentación estaban de acuerdo con la tabla 3 con la excepción del valor X0 que se estableció a 2,11 mol para producir la misma velocidad de alimentación con una botella de alimentación que en la fermentación de etanol con dos botellas de alimentación y una bomba.

Los resultados fueron como sigue:

Tiempo (h)	AFP (mg/kg)	Materia seca (g/kg)	Producción específica* (mg/g)
0	0	1,9	0
3	0	3,3	0
6	0	5,5	0
9	0	7,2	0
12	0	10,4	0
15	0	11,4	0
18	0	13,3	0
21	0,8	15,8	0,049
24	2,6	18,4	0,142
27	5,8	20,3	0,286
30	10,3	24,6	0,421
33	16,8	28,6	0,588
36	25,5	33,0	0,773
39	35,4	37,5	0,942
42	46,8	43,4	1,077
45	60,3	50,0	1,204
48	74,4	55,9	1,331
51	90,8	62,9	1,445
57	126,4	79,2	1,596
60	135,2	79,5	1,701
63	135,13	79,3	1,705

Se concluye que cuando el medio de crecimiento contiene sólo glucosa como sustrato de carbono, la producción de AFP disminuye hasta el momento en que se establecen condiciones limitantes. La producción de AFP no aumenta más y la producción desciende.

Resultados

Ejemplo 2

Etanol como fuente de carbono			Glucosa como fuente de carbono (ejemplo comparativo 2)		
VHH (mg/kg de caldo de fermentación)	Materia seca (g/kg)	Producción específica* (mg/kg)	VHH (mg/kg de caldo de fermentación)	Materia seca (g/kg)	Producción específica* (mg/kg)
0	0,91	0	0	6,63	0,00
0	6,17	0	0	12,34	0,00
0	11,66	0	106,33	25,60	4,15
141,77	21,26	6,67	248,09	35,65	6,96
927,40	48,68	19,05	425,30	45,02	9,45
1063,26	51,65	20,58	673,40	57,59	11,69
1222,75	56,68	21,57	856,52	72,22	11,86
1151,87	55,31	20,83	915,59	71,31	12,84

* Producción específica: mg de proteína heteróloga/g de materia seca

Se concluye que la producción de proteína heteróloga usando etanol como fuente de carbono es mucho más alta que con glucosa como fuente de carbono.

Resultados

Ejemplo 3

Etanol como fuente de carbono				Glucosa como fuente de carbono (ejemplo comparativo 3)			
Tiempo (h)	VHH (mg/kg de caldo de fermentación)	Materia seca (g/kg)	Producción específica* (mg/kg)	Tiempo (h)	VHH (mg/kg de caldo de fermentación)	Materia seca (g/kg)	Producción específica* (mg/kg)
3	0	2,87	0	21	103,45	17,19	6,02
6	0	5,73	0	27	127,59	20,78	6,14
9	0	6,93	0	33	227,59	28,66	7,94
33	268,97	45,37	5,93	39	272,41	36,78	7,41
36	417,24	50,86	8,20	45	327,59	47,52	6,89
39	537,93	54,45	9,88	51	413,79	57,07	7,25
42	689,66	56,36	12,24	57	503,45	64,48	7,81

				63	565,52	67,10	8,43
				69	596,55	69,73	8,56

* Producción específica: mg de proteína heteróloga/g de materia seca

Se concluye que la producción específica de proteína heteróloga usando etanol como fuente de carbono es mucho más alta que con glucosa como fuente de carbono.

Resultados

Ejemplo 4

Etanol como fuente de carbono				Glucosa como fuente de carbono (ejemplo comparativo 4)			
Tiempo (h)	VHH (mg/kg de caldo de fermentación)	Materia seca (g/kg)	Producción específica* (mg/kg)	Tiempo (h)	VHH (mg/kg de caldo de fermentación)	Materia seca (g/kg)	Producción específica* (mg/kg)
0	0,00	0,72	0,00	15	13,79	10,51	1,31
12	0,00	9,79	0,00	21	27,59	16,00	1,72
18	13,79	17,19	0,80	27	55,17	19,10	2,89
24	155,17	25,31	6,13	33	117,24	25,07	4,68
30	275,86	35,82	7,70	39	155,17	32,00	4,85
36	403,45	46,80	8,62	45	213,79	45,13	4,74
39	472,41	50,63	9,33	51	210,34	56,83	3,70
42	620,69	53,49	11,60	57	255,17	68,30	3,74
45	675,86	58,03	11,65				

* Producción específica: mg de proteína heteróloga/g de materia seca

Se concluye que la producción específica de proteína heteróloga usando etanol como fuente de carbono es mucho más alta que con glucosa como fuente de carbono.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de una proteína heteróloga por un hongo que comprende el crecimiento de dicho hongo en un medio que comprende una fuente de carbono en el que del 50 al 100% en peso de dicha fuente de carbono es etanol, y en el que el medio comprende adicionalmente un inductor.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una fase discontinua y una fase de alimentación en el que el medio de la fase de alimentación comprende una fuente de carbono de la cual del 50 al 100% en peso es etanol y en el que el medio de la fase de alimentación comprende adicionalmente un inductor.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el medio de la fase de alimentación comprende una fuente de carbono de la cual del 50 al 100% en peso es etanol y adicionalmente galactosa como inductor.

4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3 en el que el procedimiento se realiza en un fermentador, que se alimenta con medio a una velocidad de alimentación que es tal que la concentración de etanol en el fermentador se mantiene por debajo del 10% en volumen.

5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo el procedimiento una fase discontinua, una fase de inducción y una fase de alimentación en el que en dicha fase de alimentación

a) se crecen células fúngicas a una densidad celular de al menos 5 g/l en un medio que comprende cualquier fuente de carbono, sin preferencia específica, y posteriormente las células fúngicas se crecen a una densidad celular de más de 5 g/l, preferiblemente de 10 a 90 g/l, más preferido de 40 a 60 g/l, usando un medio que comprende un inductor y una fuente de carbono en el que del 50 al 100% en peso de dicha fuente de carbono es etanol,

b) después de que se haya obtenido la densidad celular de la etapa (a), se crean condiciones de crecimiento limitantes,

c) después de que se hayan establecido estas condiciones limitantes, las células se crecen adicionalmente en un medio que comprende una fuente de carbono en el que el 50-100% de dicha fuente de carbono es etanol.

6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas en el que el procedimiento se realiza como un procedimiento discontinuo de alimentación repetida.

7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas en el que el inductor se selecciona entre el grupo que comprende galactosa, metanol, temperatura y fosfatos.

8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en el que el medio de alimentación comprende del 0,1 al 10% en peso de galactosa.

9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la fuente de carbono comprende el 80-100% en peso de etanol.

10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que el hongo es una levadura, preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.

11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas en el que la proteína heteróloga se selecciona entre péptidos anticongelantes, anticuerpos o fragmentos de los mismos, y enzimas.

12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el medio discontinuo comprende el 1-40% en peso de glucosa, agua, metales traza, opcionalmente un agente antiespumante, extracto de levaduras, vitaminas, sales de fosfato y sales de sulfato y en el que el medio de alimentación comprende del 5 al 35% en volumen de etanol, el 0,1-10% en peso de galactosa, agua, metales traza, y opcionalmente un agente antiespumante, extracto de levaduras, vitaminas, sales de fosfato y sales de sulfato y en el que la "velocidad de alimentación" "φ" es de 0,25 a 4 g/min en una escala de 10 litros.