

# Sistemas innovadores para la obtención de Leghemoglobina para productos análogos de la carne

Joaquín Ariño Carmona y Marcel Albacar Carot  
27/09/2022



Generalitat de Catalunya  
**Departament d'Agricultura,  
Ramaderia, Pesca i Alimentació**



**Fons Europeu Agrícola  
de Desenvolupament Rural:**  
Europa inverteix en les zones rurals

# Introducción

- >7.8 B personas en el mundo → ↑ demanda alimentos
- ↑ proteína animal → Agravaría la crisis climática
- Posible solución → Productos análogos de la carne



Leghemoglobina (LegHb) de la soja

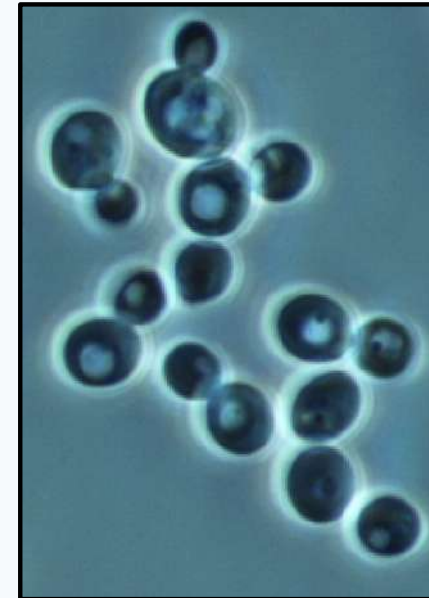


Imita el color, sabor y textura de la carne, debido al grupo hemo



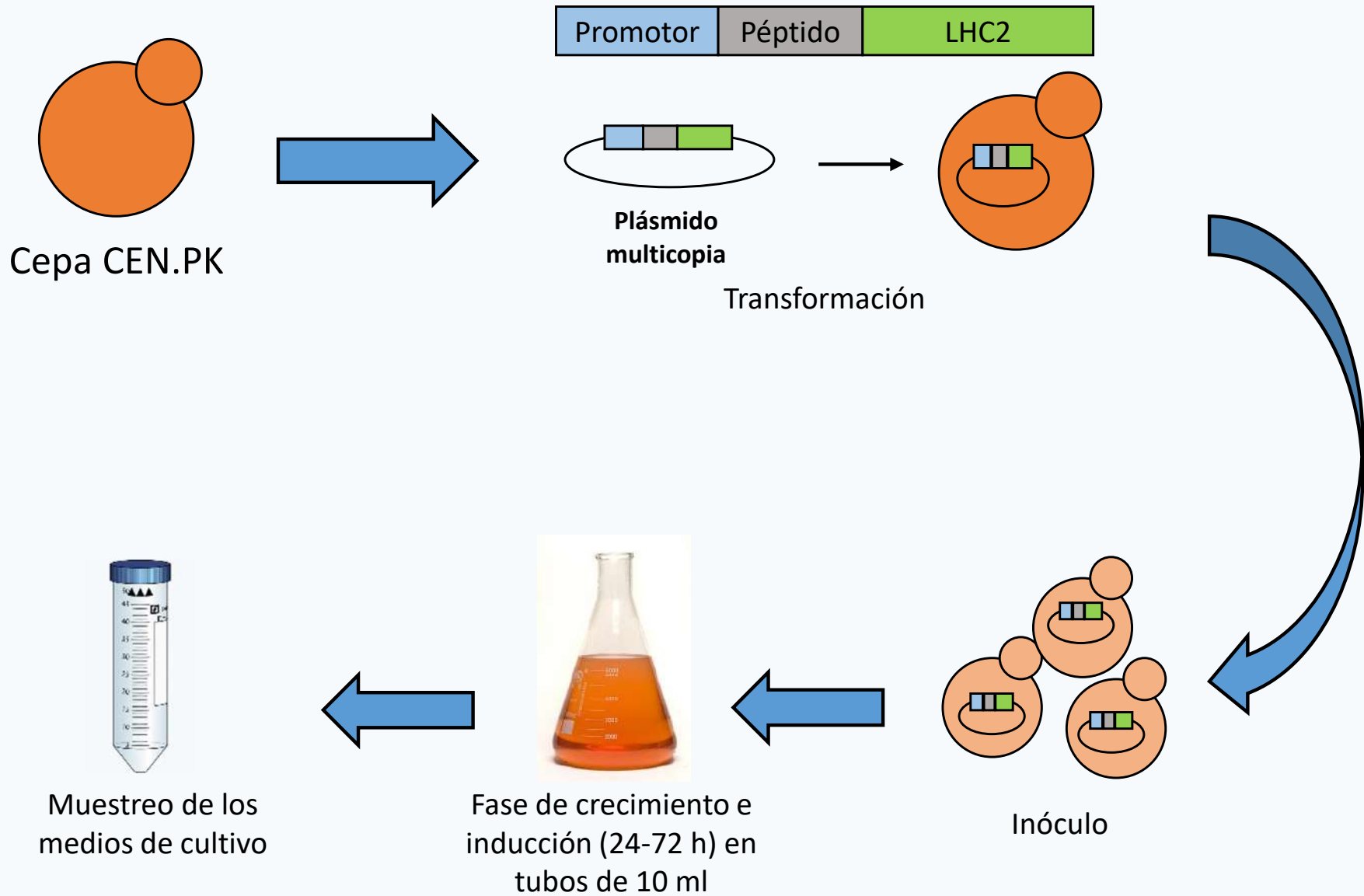
## Objetivo del proyecto

Producir leghemoglobina (LegHb)  
en grandes cantidades utilizando  
levadura.



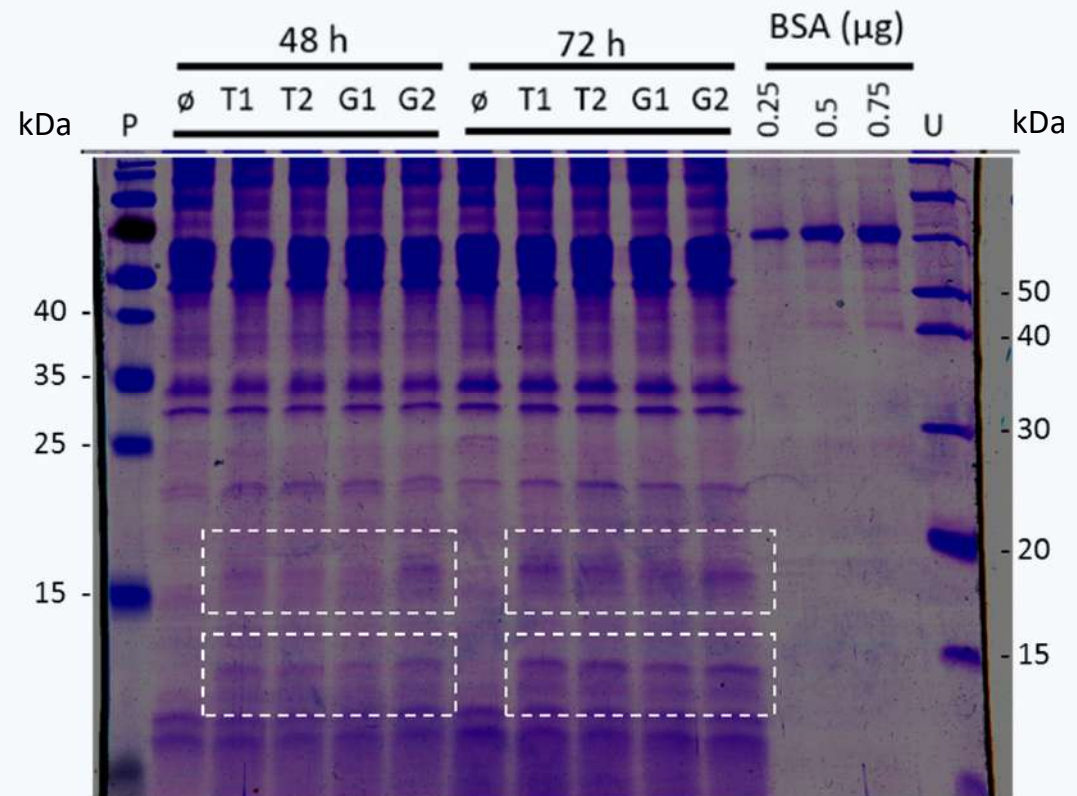
***Saccharomyces cerevisiae & Pichia pastoris***

# *S. cerevisiae* como sistema de expresión de LegHb



# *S. cerevisiae* como sistema de expresión de LegHb

Primera aproximación:  
 algunas proteínas en el medio  
 de cultivo de un tamaño  
 cercano a la LegHb (~18 kDa)  
que no se ven en el cultivo sin  
 transformar.

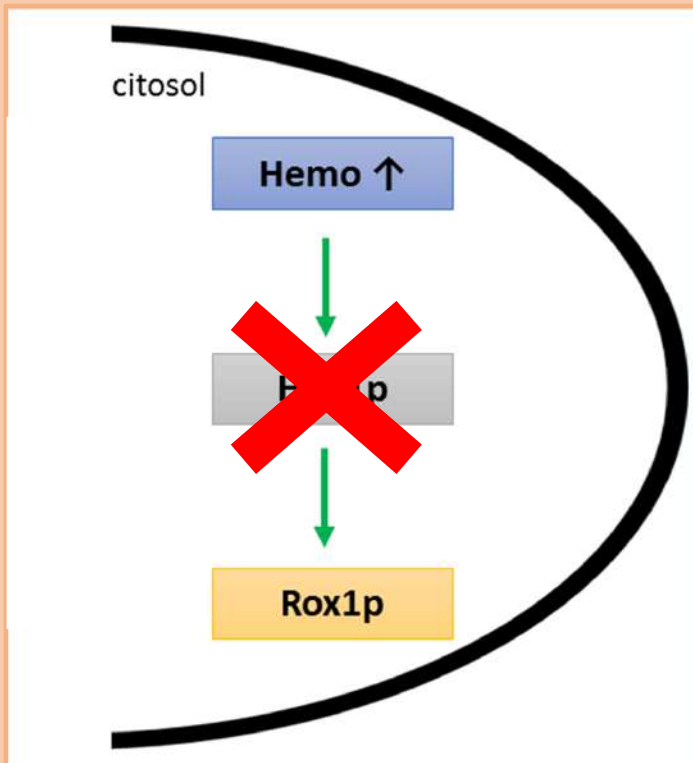


**Necesitamos mecanismos para potenciar la producción y secreción de LegHb!**

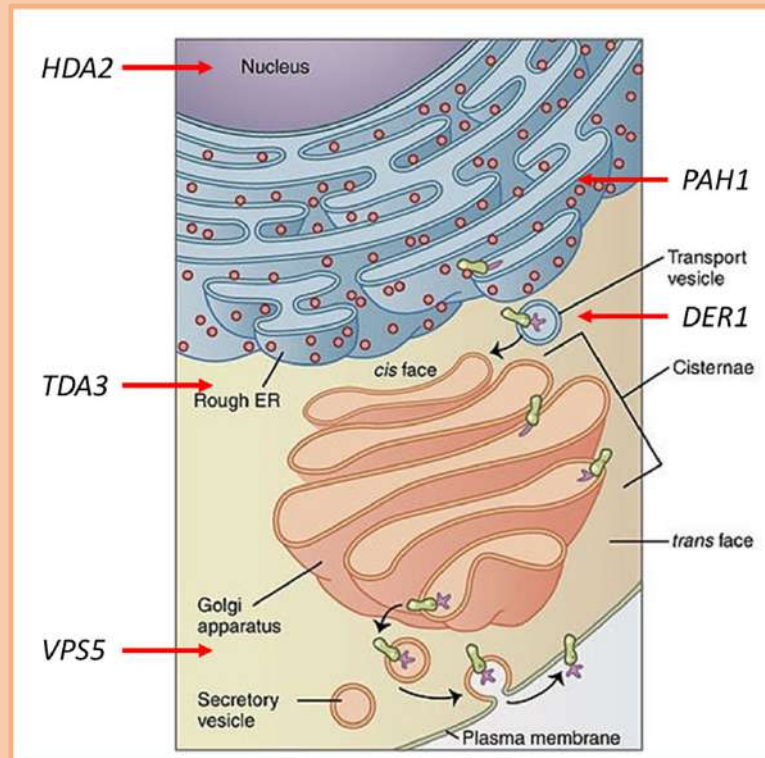
# Potenciando la secreción de LegHb en *S. cerevisiae*

## 1.- Deleciones de genes para favorecer la secreción y/o expresión de LegHb

Evitar efectos de *feedback* negativo



Potenciar la vía de secreción



Se han generado un total de 13 cepas de *S. cerevisiae*

# Potenciando la secreción de LegHb en *S. cerevisiae*

## 2.- Mejoras del péptido señal del vector de expresión

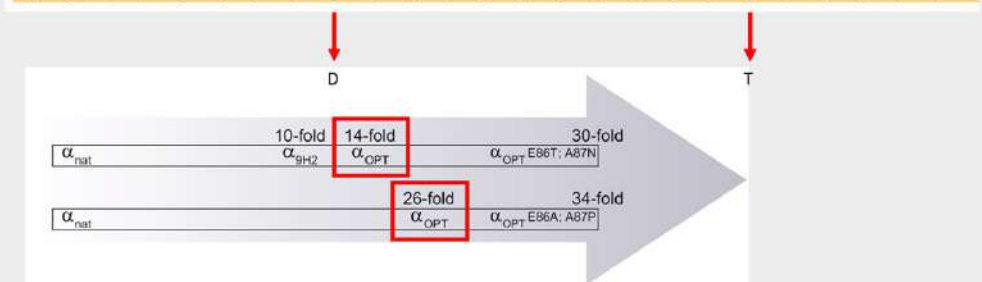
Design of an improved universal signal peptide based on the  $\alpha$ -factor mating secretion signal for enzyme production in yeast

Pablo Aza<sup>1</sup> · Gonzalo Molpeceres<sup>1</sup> · Felipe de Salas<sup>1</sup> · Susana Camarero<sup>1</sup>

Received: 7 October 2020 / Revised: 10 February 2021 / Accepted: 18 February 2021  
© The Author(s) 2021

ATGAGATTTCCATCTATTTtactgctgttttggctgcttctctgctttggctgctccagttaatactactac  
TACTCTAAAGGTAGATAAaaatgacgacaaaacaacgacgaagaagacgaaaccgacgaggtcaattatgatgatg

Alpha Pre  
M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T T



Name	ORF Composition
pES01	
pES02	
pES03	
pES04	
pES05	
pES06	
pES07	

■ LHC2    ■ Alpha-Pre    ■ Alpha-Pre pJROC30-AlphaOpt-PEL  
■ Tag 1xHA    ■ Alpha-Pro    ■ Alpha-Pro pJROC30-AlphaOpt-PEL  
■ Alpha-Pre Ost1

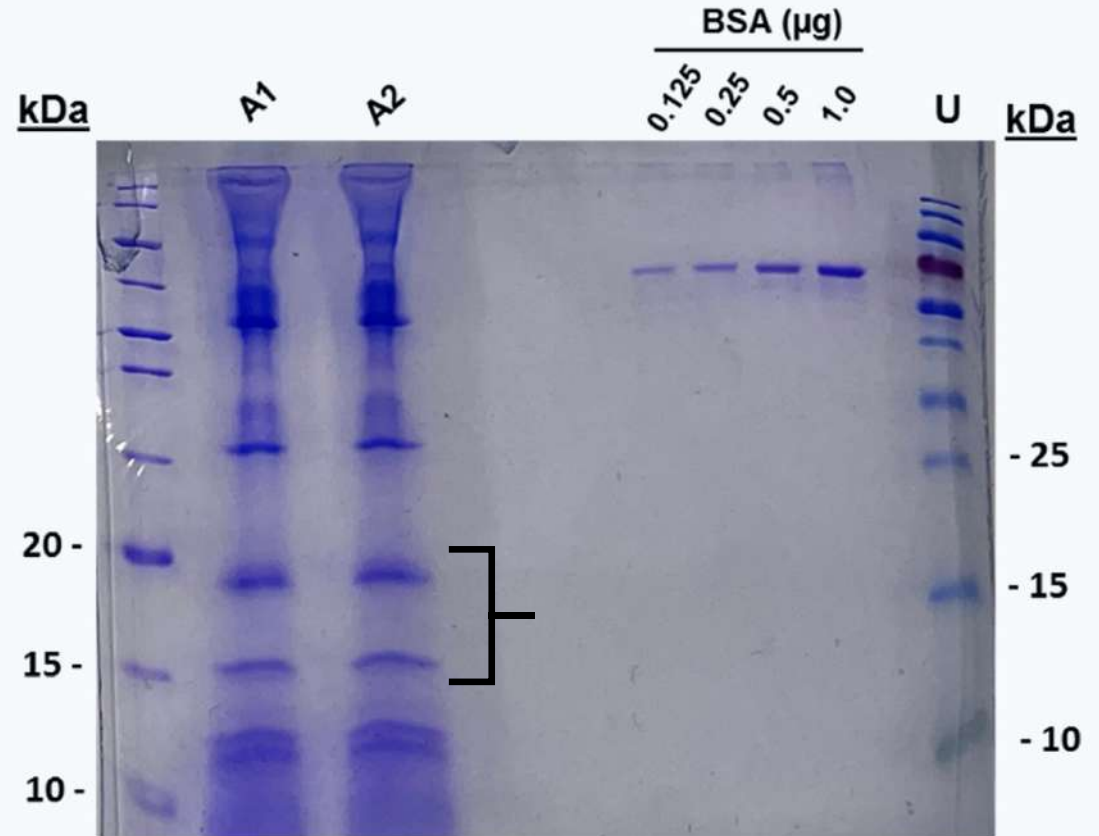
Se generaron un total de 6 nuevos vectores de expresión

# Mejor productor de *S. cerevisiae*: CEN.PK *hap1Δ* + pES07

La cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK *hap1Δ* transformada con el plásmido pES07 es la que produce mayores cantidades de LegHb



El rendimiento de nuestro mejor productor es muy pobre (~0,5 µg/mL)



Confirmado por espectrometría de masas que las dos proteínas de que aparecen entre 15 y 20 kDa son LegHb.

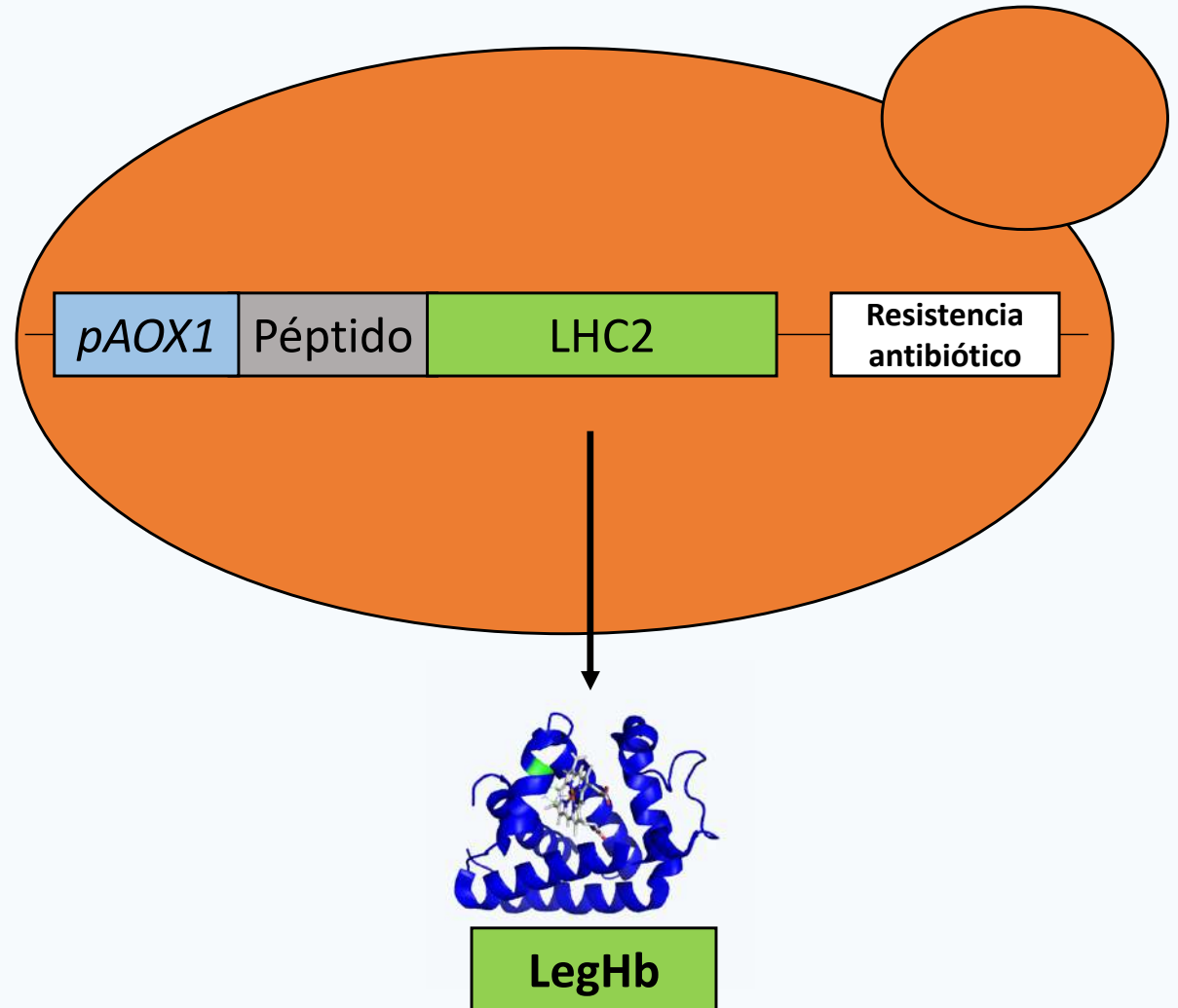


# *P. pastoris* como sistema de expresión

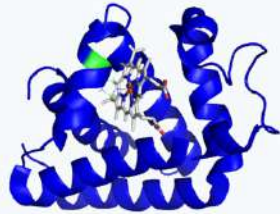
Partimos de la cepa X33 silvestre



Se integró en su genoma el gen de la LegHb bajo un promotor inducible por metanol



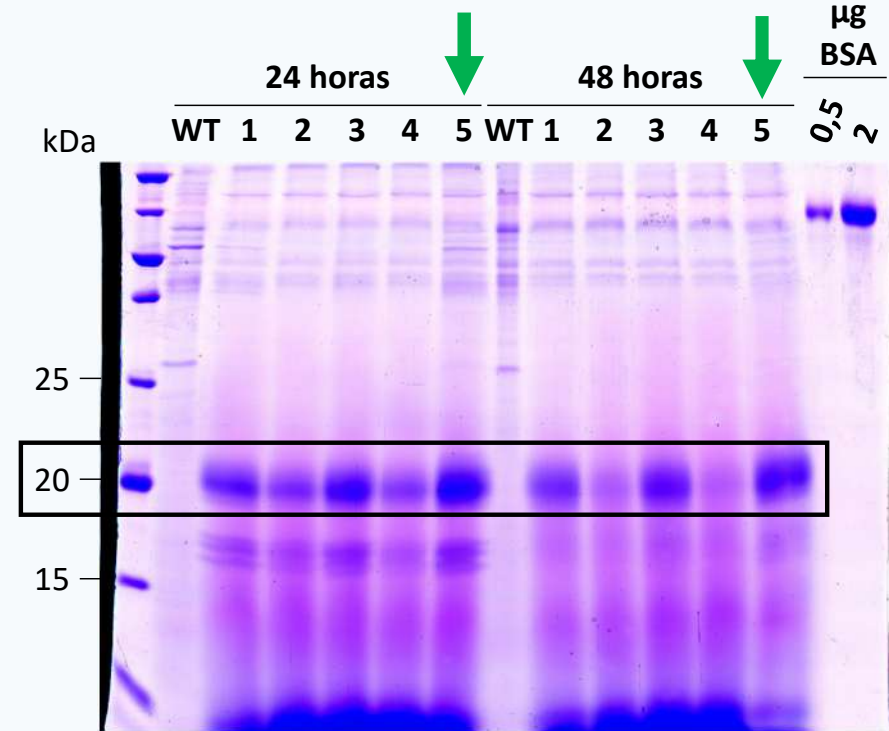
# Verificación de los niveles de expresión de LegHb



~18 kDa

**LegHb**

El clon 5 sería el mejor productor con unos 25 µg de LegHb por mililitro de cultivo



Confirmado por espectrometría de masas que la proteína que aparece a la altura de 20 kDa es LegHb.

**Necesitamos incrementar los niveles de expresión de LegHb**

# Aplicación de la estrategia de amplificación post-transformacional de vectores (PTVA) en *P. pastoris*



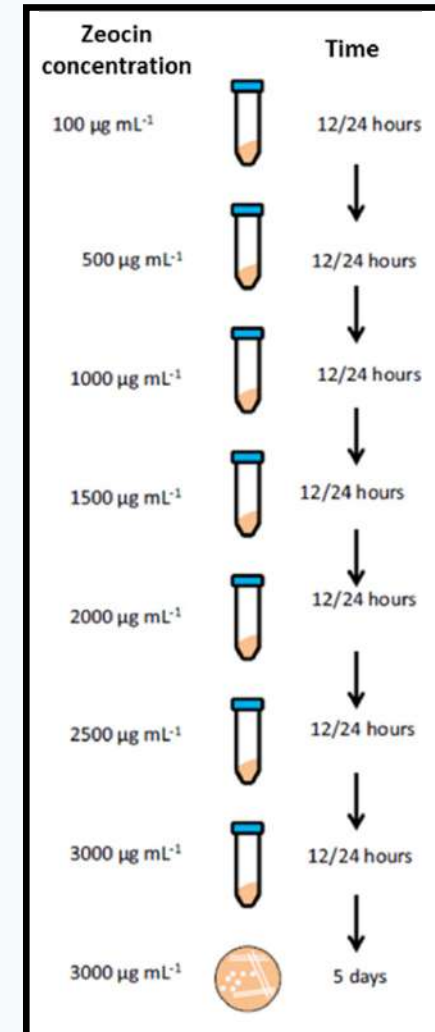
Incrementar de forma progresiva la concentración de antibiótico de selección en el medio para forzar que las células generen más copias del inserto para poder crecer a concentraciones elevadas de antibiótico.



Si incrementan las copias genómicas del inserto, incrementan las copias del gen *LHC2*.



Posible método para potenciar los niveles de expresión de LegHb.



(Aw & Polizzi, 2016. Modificada)

# Aplicación de la estrategia de amplificación post-transformacional de vectores (PTVA) en *P. pastoris*

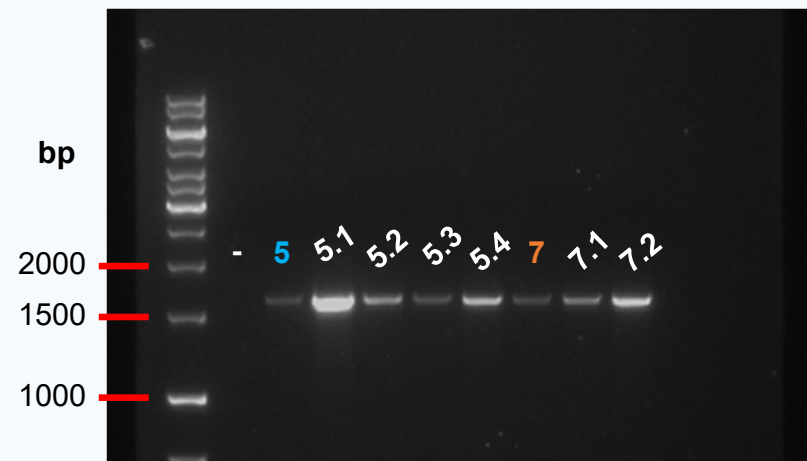
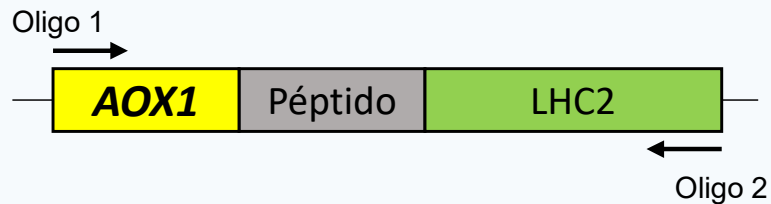


Placa PTVA-LHC2 5

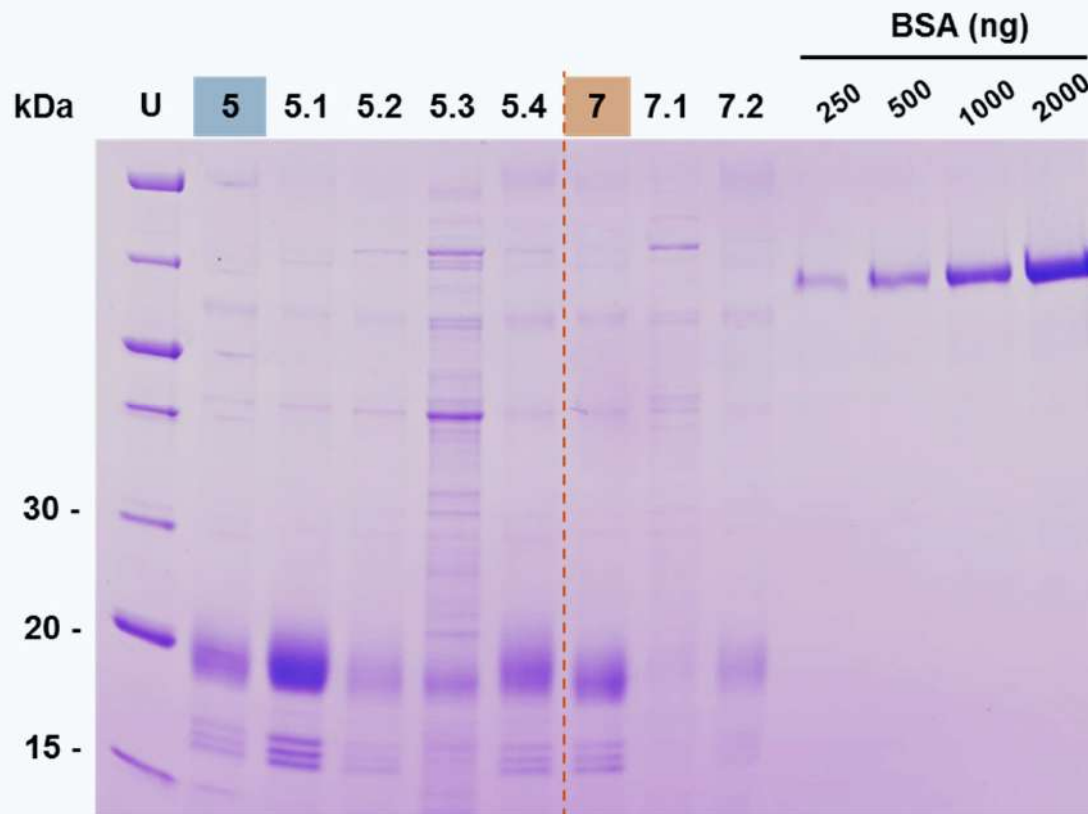


Placa PTVA-LHC2 7

4 colonias derivadas de LHC2 5 (PTVA 5.1 - 5.4)  
2 colonias derivadas de LHC2 7 (PTVA 7.1 y 7.2)



# PTVA: Test de crecimiento y muestreo de las nuevas cepas

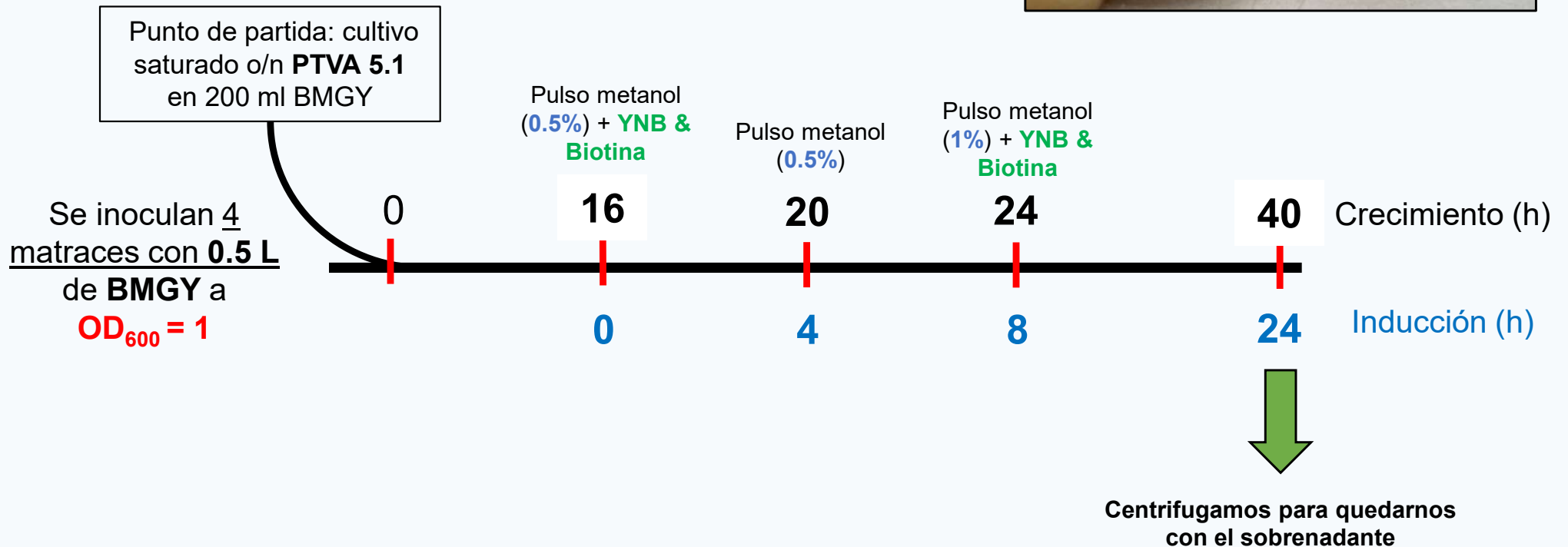


Cepa	LegHb (ng)	Concentración (µg/ml)
LHC2 5	1391,00	93,92
<b>PTVA 5.1</b>	<b>2932,69</b>	<b>198,02</b>
PTVA 5.2	631,33	42,63
PTVA 5.3	497,70	33,61
PTVA 5.4	1345,47	90,85
LHC2 7	1445,81	97,62
PTVA 7.1	20,48	1,38
PTVA 7.2	489,69	33,06

**La cepa PTVA 5.1 produce el doble de LegHb que su cepa original**

# Proceso de producción de LegHb a mayor escala

- Fase de crecimiento e inducción

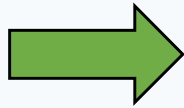


# Proceso de producción de LegHb a mayor escala

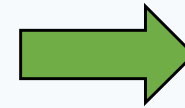
- Fase de concentrado y diálisis



Al final del crecimiento se recuperan ~2.4 L de sobrenadante



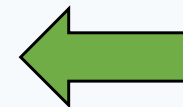
Se concentran usando el *Amicon Stirred Cell*® (400 ml)



Se detiene el concentrado cuando se alcanzan 40 - 60 ml de volumen



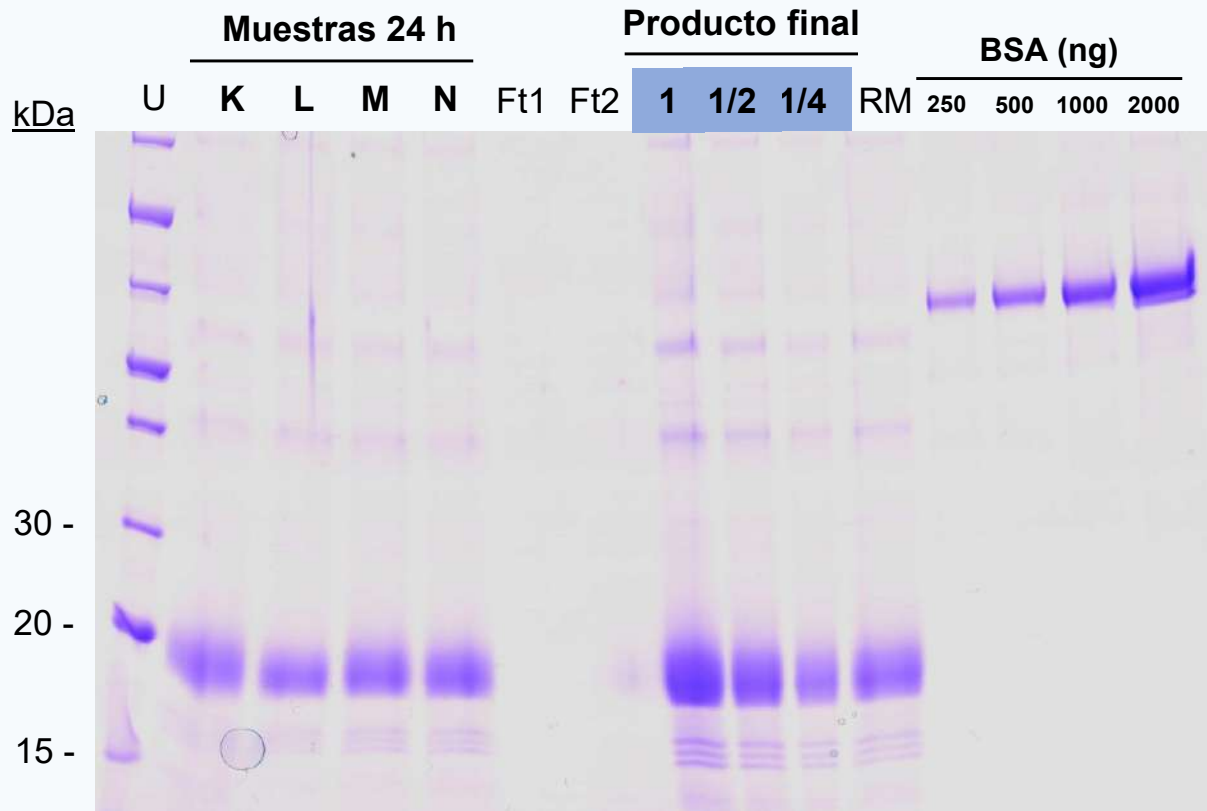
El producto final de la diálisis se reparte en recipientes y se procesa para su posterior liofilización



Se dializa el contenido mediante dos lavados de PBS y se concentra de nuevo hasta 40 - 60 ml

# Proceso de producción de LegHb a mayor escala

- Evaluación niveles de los niveles de expresión



Muestra	LegHb (ng)	Rendimiento (µg/ml)	mg totales
Conc	3917,07	3917,07	235,02
Conc 1/2	2867,08	5734,17	344,05
Conc 1/4	1379,66	5518,63	331,12
RM	2096,26	139,75	5,59

Valores en rojo: fuera de la recta

Repetimos este proceso hasta acumular más de 1 g de LegHb



## Conclusiones

- *S. cerevisiae* está muy lejos de ser el mejor sistema de expresión para un proyecto de estas características, debido a los bajos niveles de producción.
- *P. pastoris*, incluso sin **modificaciones genéticas adicionales**, se muestra como un buen productor de LegHb. Con la estrategia PTVA y una optimización de las condiciones de crecimiento hemos pasado de 25 mg de LegHb por litro a cerca de 200 mg/L.
- A pesar de habernos sido útil para fabricar más de 1 g de LegHb, posiblemente habría que potenciar la vía de síntesis de hemo en las cepas generadas. Ello garantizaría la presencia del compuesto en las moléculas de LegHb secretadas, condición que parece necesaria para mimetizar **las propiedades organolépticas de la carne en derivados vegetales**.

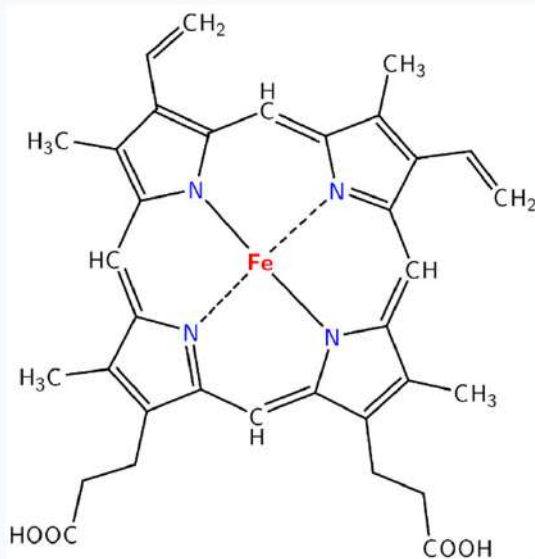






## Ensayos de detección de hemo

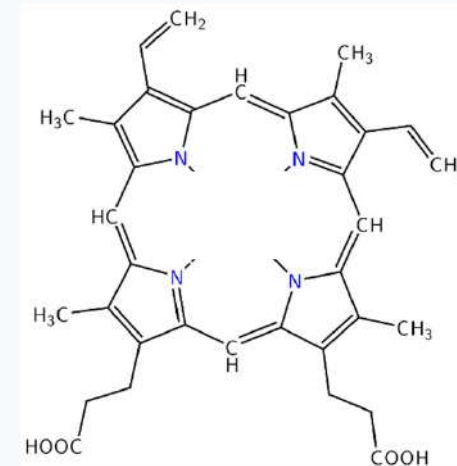
- Nueva aproximación: Método fluorimétrico



Grupo hemo



30 minutos a 100 °C en presencia  
de ácido oxálico 2 M



Compuesto fluorescente

$Fe^{2+}$

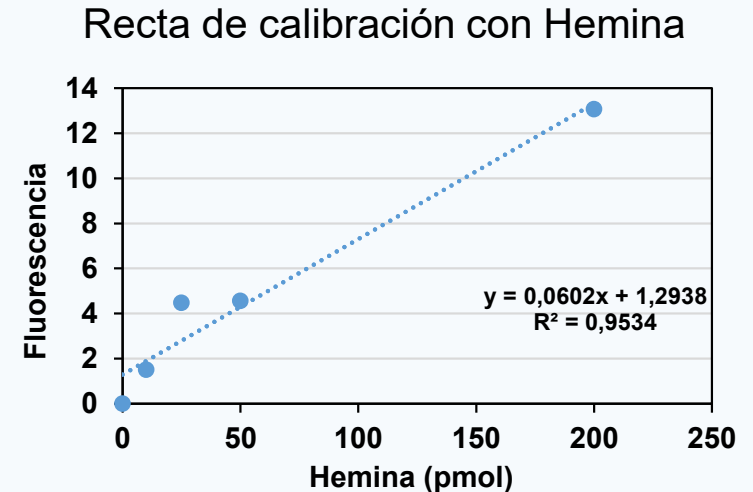
Hierro libre

La principal ventaja de este método es que es muy sensible, detectando hasta 0.5 pmol de hemo por muestra.

## Ensayos de detección de hemo

- Nueva aproximación: Método fluorimétrico

Utilizando una recta de calibración podemos calcular el contenido de hemo que tiene nuestra muestra.



**Hemos podido detectar 9,77 ng de Fe de los 754 ng esperados en una muestra de 40 µl de producto final (a 4,9 µg/µl).**



Este análisis fluorimétrico está diseñado para ensayos con tejido animal y habría que optimizarlo para nuestras muestras.

