



Universitat Autònoma de Barcelona



Utilización de glicerol proveniente de la industria de biodiesel como fuente de carbono para la producción de lipasas recombinantes en *Pichia pastoris*.

Memoria para optar al Grado de
Doctor en Biotecnología por la
Universidad Autónoma de Barcelona

NELSY LOANGO CHAMORRO

Bellaterra, mayo de 2015

FRANCISCO VALERO BARRANCO y JOSÉ LUIS MONTESINOS SEGUÍ,
catedrático y profesor titular del Departamento de Ingeniería Química de la
Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que la magister Nelsy Loango Chamorro ha realizado, bajo nuestra dirección,
en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, el trabajo con el título
**“Utilización de glicerol proveniente de la industria de biodiesel como fuente de
carbono para la producción de lipasas recombinantes en *Pichia pastoris*”** que se
presenta en esta memoria, la cual constituye su Tesis para optar al Grado de Doctor
por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para dejar constancia y que tenga los efectos que corresponda, se presenta ante la
Escuela de Doctorado de la Universidad Autónoma de Barcelona la mencionada Tesis,
firmando esta certificación.

Bellaterra, mayo de 2015

Dr. Francisco Valero Barranco

Dr. José Luis Montesinos Seguí

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una u otra forma, han hecho posible la realización de este trabajo.

Mi mayor agradecimiento a Paco y José Luis, por darme la oportunidad de realizar esta tesis y poner a mi disposición su calidad científica y docente, gracias por su apoyo incondicional, paciencia, dedicación, comprensión y los invaluable aportes a mi formación. Mi mayor gratitud por la tolerancia y la comprensión, particularmente en estos últimos tiempos.

A Patricia Landazuri, Gracias por guiarme y aconsejarme, por creer siempre en mí y por su entusiasmo a la hora de emprender cosas nuevas. Gracias además por ser compañera y amiga, aconsejando y brindando apoyo en lo personal, lo que demuestra una gran persona, con respeto y cariño hacia uno.

A los amigos de diversas hazañas, Miguel, Diego, Nelson. Imprescindibles e insustituibles. Que sería de mí sin poder desconectar el fin de semana o una noche cualquiera en las calles de Barcelona, Especialmente a Angélica que se convirtió en una gran amiga y aliada, fue un soporte importante y cómplice de todos mis eventos laborales y personales.

A los amigos del diario vivir en la etse, José, Andrea, Violeta, Lorena, Rossmery, Andreia, Susan, Luis, Mabel, David, Xavi P. Gracias a todos por hacer de esta tesis no solo un trabajo, sino una gran experiencia de vida.

Gracias especiales a Margot compañera inigualable en las arduas horas de trabajo y las pocas de ocio “un cafecito para faenar”, por sus invaluable consejos. Gracias a los amigos que desde la distancia siempre creyeron en mí y fueron una voz de aliento Fabiana, Mélida, Alejandra, Johanny.

A los Lipaseros, aldolaseros y al personal del Departamento de Ingeniería Química por su calurosa acogida y soporte.

A mi familia, que siempre han apoyado sea cual sea la decisión que haya tomado. A Liliana que desde la distancia fue un gran soporte familiar.

Y finalmente quiero dedicar este trabajo a Juan y Carlos, quienes me dieron la oportunidad de conocer algo tan importante como el amor incondicional, la grandeza de ser alguien importante para una persona, a dar y compartir el amor, la ternura.

Tabla de Contenido

	Página
Resumen.....	1
Capítulo 1 Objetivos.....	5
Capítulo 2 Introducción.....	9
2.1. Sistemas de Expresión de Proteínas Recombinantes.....	11
2.1.1. Sistemas de Expresión en Bacterias.....	13
2.1.2. Sistemas de Expresión en Levaduras.....	14
2.1.3. Sistemas de Expresión en Cultivo de Células Animales.....	15
2.1.4. Otros Sistemas de Expresión.....	16
2.2. <i>Pichia pastoris</i> como Sistemas de Expresión de Proteínas.....	17
2.2.1. Promotores.....	18
2.2.2. Promotor de la Alcohol Oxidasa.....	19
2.2.3. Metabolismo al metanol en <i>P. pastoris</i>	20
2.2.4. Metabolismo al glicerol el <i>P. pastoris</i>	21
2.2.5. Producción de proteína heterólogas en <i>P. pastoris</i>	22
2.3. Lipasas.....	24
2.3.1. Estructura y función.....	24
2.3.2. Aplicaciones Biotecnológicas de las Lipasas.....	25
2.3.3. Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> (ROL).....	26
2.3.4. Producción de ROL en <i>P. pastoris</i>	27
2.4. Glicerol Crudo de Biodiesel como sustrato.....	29
2.4.1. Biodiesel.....	29
2.4.2. Glicerol de Biodiesel.....	32
2.5. Bibliografía.....	35
Capítulo 3 Materiales y Métodos.....	39
3.1. Cepas, Soluciones y medios de cultivo.....	41
3.1.1. Cepas.....	41
3.1.2. Soluciones.....	41
3.1.3. Medios de Cultivo.....	42
3.2. Fermentador.....	44
3.3. Protocolo de fermentación.....	45
3.3.1. Inóculo.....	45
3.3.2. Cultivo en Discotínuo (<i>Batch</i>).....	45
3.3.3. Cultivo en Semicotínuo (<i>Fed-Batch</i>).....	46
3.3.4. Sistema de Adición de sustratos y cosustratos.....	47
3.4. Métodos Analíticos.....	48
3.4.1. Determinación de la Concentración de Biomasa.....	48
3.4.2. Determinación de la Actividad Lipolítica Extracelular.....	48
3.4.3. Análisis Cuantitativo de Proteínas.....	50
3.4.4. Determinación de la Actividad Proteolítica.....	51
3.4.5. Determinación de la Actividad Alcohol Oxidasa Intracelular.....	52
3.4.6. Determinación de la Concentración de Glicerol, Sorbitol y Metanol.....	52
3.4.7. Monitorización en Línea de la Concentración de Metanol.....	53
3.5. Cálculos.....	53
3.5.1. Cálculo de las Velocidades Específicas.....	53
3.5.2. Cálculo de los Rendimientos.....	55
3.5.3. Cálculo de las Productividades.....	56
3.6. Bibliografía.....	58

Capítulo 4	Producción de ROL recombinante en la factoría celular <i>Pichia pastoris</i> mediante la utilización de glicerol crudo, obtenido como subproducto en la producción de biodiesel.....	59
4.1	Resumen.....	61
4.2	Introducción.....	64
4.3	Resultados y Discusión.....	68
4.3.1.	Caracterización del Glicerol Crudo de Biodiesel.....	68
4.3.2.	Cultivo en Erlenmeyers.....	69
4.3.3.	Cultivos en Discontinuo en Biorreactor.....	72
4.3.4.	Cultivo Semicontinuo en Biorreactor.....	77
4.4	Conclusiones.....	85
4.5	Bibliografía.....	86
Capítulo 5	Producción de ROL recombinante en cultivos semicontinuos utilizando como estrategia de operación alimentación mixta a una velocidad específica de crecimiento fijada con glicerol y pulsos de metanol.....	89
5.1	Resumen.....	91
5.2	Introducción.....	93
5.3	Resultados y Discusión.....	96
5.3.1.	Producción de ROL en cultivo semicontinuo alimentado con pulsos de metanol (10 g/L – 12h).....	97
5.3.2.	Producción de ROL en cultivo semicontinuo con sustratos mixtos: alimentación exponencial con glicerol ($\mu=0.1 \text{ h}^{-1}$) y pulsos de metanol a 10 g/L cada 2 h.....	99
5.3.3.	Producción de ROL en cultivo semicontinuo con sustratos mixtos utilizando pulsos de metanol a diferente frecuencia y alimentación exponencial con glicerol a una velocidad específica de 0.02 h^{-1}	103
5.3.4.	Comparación de los resultados utilizando la estrategia de alimentación con pulsos de metanol a diferentes concentraciones y frecuencia, alimentando glicerol como cosustrato a una velocidad de crecimiento de 0.02 h^{-1}	105
5.3.5.	Pureza de la proteína recombinante obtenida durante los ensayos de alimentación con pulsos de metanol.....	109
5.4	Conclusiones.....	111
5.5	Bibliografía.....	112
Capítulo 6	Producción de ROL recombinante en cultivo semicontinuo utilizando como estrategia de alimentación mixta una adición exponencial preprogramada de glicerol (control en lazo abierto) y control en línea de metanol.....	115
6.1	Resumen.....	117
6.2	Introducción.....	119
6.3	Resultados y Discusión.....	123
6.3.1.	Producción de ROL en cultivo semicontinuo, alimentado con glicerol a una μ de 0.02 h^{-1} y metanol a 2 g/L.....	124
6.3.2.	Evaluación de la pureza del producto cuando se utiliza la estrategia de alimentación con sustratos mixtos con control en línea con metanol y alimentación exponencial con glicerol.....	127
6.4	Conclusiones.....	131
6.5	Bibliografía.....	132
Capítulo 7	Producción de ROL recombinante mediante la utilización de glicerol/sorbitol y metanol en cultivo semicontinuo utilizando alimentación exponencial preprogramada.....	135

7.1	Resumen.....	137
7.2	Introducción.....	139
7.3	Resultados y Discusión.....	144
7.3.1	Comparación de los cultivos realizados bajo las mismas condiciones utilizando como cosustratos glicerol o sorbitol.....	145
7.3.2	Cultivo semicontinuo alimentado con sustratos mixtos con una velocidad específica de crecimiento sobre glicerol a 0.04 h^{-1} y metanol a 0.02 h^{-1}	150
7.4	Conclusiones.....	156
7.5	Bibliografía.....	157
Capítulo 8: Conclusiones.....		161
Capítulo 9: Anexos.....		167

RESUMEN

En este trabajo se recogen los resultados obtenidos en el estudio de la producción extracelular de la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) expresada en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* bajo el P_{AOX1} , utilizando una estrategia de alimentación con sustratos mixtos en la etapa de inducción para cultivos semicontinuos, con el fin de evaluar la viabilidad del uso del glicerol crudo como cosustrato en la producción de la lipasa para su posterior uso en la producción enzimática de biodiesel.

En primer lugar se consideró la valorización del glicerol crudo obtenido a partir de aceites vegetales naturales y reciclados en la producción de biodiesel como una fuente de carbono para el crecimiento celular y la producción de la ROL. Se concluyó que en los procesos fermentativos con *P. pastoris* la utilización de glicerol crudo permite el crecimiento de la levadura y además no se evidencia un efecto negativo al utilizar glicerol crudo proveniente de la producción de biodiesel, en términos de rendimiento y velocidad específica de crecimiento.

El sistema de expresión de la ROL en *P. pastoris* utilizando el P_{AOX1} depende de la utilización del metanol como sustrato inductor. En este trabajo se probaron diversas estrategias de adición de sustratos mixtos en cultivos semicontinuos para evaluar la producción de la proteína recombinante bajo este sistema de expresión.

En primera instancia se llevó a cabo una alimentación mixta adicionando pulsos de metanol y alimentación exponencial con un cosustrato (glicerol). En el ensayo inicial, se alimentó con metanol como única fuente utilizando pulsos de metanol. Los resultados muestran que la estrategia de adición de metanol como único sustrato cada 12 horas mediante pulsos, resulta negativo tanto para el crecimiento como para la producción del producto heterólogo. En ensayos posteriores se realizaron cultivos en semicontinuo con una estrategia de alimentación mixta utilizando dos velocidades específicas de crecimiento con adición exponencial preprogramada de glicerol (0.1 y 0.02 h^{-1}) y pulsos de metanol a dos concentraciones (10 y 5 g/L) adicionados a diferentes periodos de tiempo (1 , 2 , 6 , y 12 h). Al utilizar una μ de glicerol de 0.1 h^{-1} el consumo de metanol se ve afectado, evidenciándose una clara represión del P_{AOX1} . La concentración de los pulsos de metanol y su frecuencia tienen una influencia significativa en la producción del producto heterólogo.

Posteriormente, se realizó una alimentación manteniendo fija la concentración de metanol (1.5 y 2 g/L) y el cosustrato siguiendo una alimentación preprogramada para una velocidad específica de crecimiento constante (0.02 h^{-1} y 0.05 h^{-1}), Los resultados obtenidos mostraron que la producción de ROL en *P. pastoris* no es comparable entre las cepas Mut⁺ y Mut^s, aunque se empleen estrategias de cultivo similares. La presencia del glicerol como cosustrato no mejora la producción, ni la velocidad específica de producción.

En las últimas estrategias, se planteó la utilización de sustratos mixtos en una alimentación exponencial preprogramada de glicerol a 0.02 y 0.04 h^{-1} con metanol para una velocidad específica de crecimiento de 0.02 h^{-1} , y se realizó una comparación utilizando como cosustrato sorbitol a una velocidad de crecimiento de 0.02 h^{-1} con metanol para la misma velocidad específica de crecimiento.

Se observa que el comportamiento de la cepa con sustratos mixtos glicerol y sorbitol a nivel de rendimiento $Y_{p/x}$ y productividad volumétrica presenta un comportamiento parecido al reportado cuando se utiliza metanol como única fuente de carbono. Los resultados de la velocidad específica de consumo de metanol son iguales cuando se utiliza metanol como única fuente de carbono y cuando se utiliza sorbitol como cosustrato, lo que muestra que el sorbitol no ejerce acciones represoras sobre el promotor P_{AOX1} , contrario a lo observado cuando se utiliza glicerol como cosustrato donde el consumo de metanol disminuye 2.6 veces; mostrándose que, a pesar de encontrarse en condiciones limitantes el glicerol reprime al promotor P_{AOX1} .

Al utilizar glicerol y metanol como cosustratos se observa un aumento significativo de la actividad proteolítica independientemente de la velocidad específica de crecimiento sobre glicerol, lo que no se observó al utilizar sorbitol como cosustrato. Los niveles de biomasa alcanzados en los cultivos con glicerol como cosustrato son mayores que los alcanzados con sorbitol, por lo que puede ser que haya un mayor efecto de lisis celular en los cultivos con glicerol de forma que se recuperan más contaminantes en el producto final, sobre todo en etapas avanzadas del cultivo, ocasionando una disminución en la actividad específica de la proteína recombinante.

Abstract

In this work the results obtained in the study of the production of extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* (ROL) expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under the P_{AOX1} , using a strategy of feeding mixed substrates in the induction stage in semi-continuous cultures are shown.

Firstly, the valorization of crude glycerol obtained from natural and recycled vegetable oils in the biodiesel production as a carbon source for cell growth and production of ROL was evaluated. It was concluded that in fermentation processes with *P. pastoris* using crude glycerol allows the growth of yeast and no negative effect is observed in terms of yield and specific growth rate.

The ROL expression system in *P. pastoris* using the P_{AOX1} depends on the use of methanol as the inductor substrate. In this work various strategies are tested to evaluate the use of mixed substrates for the production of recombinant protein under this expression system. Preliminarily, it is carried out by adding pulses of methanol and following an exponential feeding of the co-substrate (glycerol). The results show that the strategy of adding methanol pulses as the sole substrate every 12 hours is negative for both, cell growth and production of heterologous product. In subsequent fermentations, semi-continuous cultures using two specific growth rates with preprogrammed exponential addition of glycerol (0.1 and 0.02 h⁻¹) and methanol pulses at two concentrations (10 and 5 g/L) added at different time periods (1, 2, 6, and 12 h) were performed. When using $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$ glycerol-methanol consumption is affected, showing a clear repression of P_{AOX1} . The concentration of the methanol pulses and its frequency has a significant influence on the production of the heterologous product.

Subsequently, a different strategy was performed by maintaining the methanol concentration (1.5 and 2 g/L) and the co-substrate following a preprogrammed feeding with constant specific growth rate (0.02 h⁻¹ and 0.05 h⁻¹) The results have shown that the production of ROL in *P. pastoris* is not comparable between the Mut⁺ and Mut^s similar strains though cultivation strategies are employed. The presence of glycerol as co-substrate production does not improve the production, and the specific production rate.

Finally, the use of mixed substrates was carried out using combined preset exponential feeding of glycerol (0.02 h^{-1} and 0.04 h^{-1}) with methanol addition for a specific growth rate of 0.02 h^{-1} . A comparison was made with the use of sorbitol as co-substrate at specific growth rate of 0.02 h^{-1} with methanol addition to let the same specific growth rate.

It is noted the the values of $Y_{p/x}$ and volumetric productivity when glycerol and sorbitol are used as mixed substrates are very similar than reported when methanol is used as sole carbon source. The results of the specific rate of methanol consumption are equivalent when methanol is used as sole carbon source and when sorbitol is used as co-substrate, which shows that the sorbitol do not exerts repressive action on the P_{AOX1} promoter, contrary to what was observed when using glycerol as co-substrate where methanol consumption decreases 2.6 times; stating that, despite being in limiting conditions glycerol P_{AOX1} represses the promoter.

Additionally, by using methanol and glycerol as co-substrates a significant increase in the proteolytic activity regardless of the specific growth rate of glycerol is observed. However, this fact was not observed when using sorbitol as co-substrate. Biomass levels achieved in cultures with glycerol as co-substrate are greater than those obtained with sorbitol, which might led to a greater cell lyses process and so, more contaminants in the final product, specially in later culture steps, causing a decrease in the specific activity of the recombinant protein.

Capítulo 1

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación está integrado dentro de los trabajos que se llevan a cabo en el Grupo de Ingeniería de Bioprocesos y Biocatálisis Aplicada del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona que tiene como una de sus líneas de investigación el desarrollo y optimización de procesos de producción de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *P. pastoris*.

Este trabajo tiene como objetivo principal determinar si el glicerol crudo proveniente de la industria de producción de biodiesel puede ser utilizado directamente como fuente de carbono por la factoría celular *Pichia pastoris*. Posteriormente, se optimizará la producción recombinante de una lipasa del hongo *R. oryzae* expresada en este sistema hospedero con el fenotipo Mut⁺ bajo el P_{AOX1} utilizando una estrategia de alimentación con sustratos mixtos (metanol-glicerol) en la etapa de inducción en cultivos semicontinuos. De este modo, la lipasa producida sería utilizada como biocatalizador en la síntesis enzimática de biodiesel.

Para lograr este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Valorizar el glicerol crudo obtenido como subproducto en la producción de biodiesel para su utilización directa en el crecimiento celular y la producción de la ROL en *P. pastoris*.
2. Implementar diferentes estrategias de adición de los sustratos glicerol-metanol en cultivos en semicontinuo y determinación de la estrategia óptima que maximice la producción de la lipasa, la pureza del producto final y minimizando posibles problemas operacionales.
3. Evaluar una estrategia de operación simple basada en una alimentación pre-exponencial de glicerol para mantener una velocidad específica de crecimiento constante sobre este sustrato y pulsos de metanol a diferente frecuencia y concentración. Esta simple estrategia se piensa poder implementar fácilmente en el laboratorio de origen de la doctoranda, en la Universidad de Quindío en Colombia.
4. Evaluar el efecto de la alimentación con sustratos mixtos sobre la producción de ROL utilizando una concentración de metanol constante en el medio de fermentación y una velocidad específica de crecimiento preprogramada utilizando glicerol como cosustrato.
5. Evaluar el efecto de la alimentación con sustratos mixtos (glicerol-metanol, sorbitol-metanol) sobre la producción de ROL mediante la combinación de una adición exponencial pre-programada de cada sustrato, alimentados de forma independiente en el medio de cultivo durante el bioproceso, trabajando de esta manera siempre en condiciones limitantes de ambos sustratos.

Capítulo 2

INTRODUCCIÓN

Contenido

2. INTRODUCCION.....	9
2.1. Sistemas de Expresión de Proteínas Recombinantes	11
2.1.1. Sistemas de Expresión en Bacterias	13
2.1.2. Sistemas de Expresión en Levaduras.....	14
2.1.3. Sistemas de Expresión en Cultivo de Células Animales	15
2.1.4. Otros Sistemas de Expresión	16
2.2. <i>Pichia pastoris</i> como Sistemas de Expresión de Proteínas	17
2.2.1. Promotores.....	18
2.2.2. Promotor de la Alcohol Oxidasa.....	19
2.2.3. Metabolismo del metanol en <i>P. pastoris</i>	20
2.2.4. Metabolismo del glicerol en <i>P. pastoris</i>	21
2.2.5. Producción de proteína heterólogas en <i>P. pastoris</i>	22
2.3. Lipasas.....	24
2.3.1. Estructura y Función.....	24
2.3.2. Aplicaciones Biotecnológicas de las Lipasas	25
2.3.3. Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>	26
2.3.4. Producción de ROL en <i>P. pastoris</i>	27
2.4. Glicerol Crudo de Biodiesel como sustrato.....	29
2.4.1. Biodiesel.....	29
2.4.2. Glicerol de Biodiesel.....	32
2.5. Bibliografía	35

2. INTRODUCCION

2.1. Sistemas de Expresión de Proteínas Recombinantes

La Biotecnología consiste en un gradiente de tecnologías que van desde las técnicas de biotecnología tradicional, largamente establecidas y ampliamente conocidas y utilizadas (fermentación de alimentos y control biológico), hasta la biotecnología moderna aplicada a la ingeniería genética, basada en la utilización de las nuevas técnicas del ADN recombinante (ADNr), la fusión celular y los nuevos métodos de cultivo de células y tejidos (Yin et al., 2007; Yang et al., 2011). El avance en la investigación de numerosas técnicas de ingeniería genética ha llevado al desarrollo de la biotecnología de proteínas que implica el aislamiento, producción y mejoramiento de las propiedades biológicas de proteínas específicas a partir de diversas fuentes naturales tales como plantas, animales o microorganismos, para su utilización en diversas aplicaciones básicas e industriales.

La tecnología del ADNr juega un papel importante en el desarrollo de la biotecnología de proteínas. Gracias a la manipulación de genes ha sido posible producir grandes cantidades de proteínas, muchas de las cuales se encuentran en concentraciones muy bajas en su ambiente natural. Se considera una proteína recombinante (Pr) o proteína heteróloga aquella proteína cuya síntesis se realiza en un organismo diferente al organismo nativo. Actualmente se ofrecen en el mercado una gran variedad de proteínas recombinantes para un amplio abanico de aplicaciones, incrementándose día a día la lista de estos productos, lo que ha llevado a construir toda una revolución en el mercado biotecnológico y a la vez ha impulsado la investigación en este campo (Walsh, 2006).

Para la producción de Pr se hace uso de múltiples sistemas de expresión disponibles comercialmente o desarrollados con fines de investigación, o bien se pueden diseñar y construir sistemas de expresión según las necesidades específicas. Un sistema de expresión lo conforman un organismo hospedero y un vector de expresión o fragmentos de ADN que poseen elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en el organismo hospedero, además de recibir las moléculas de ADNr (Porro et al., 2011).

Diseñar un sistema óptimo para la producción de una proteína recombinante implica pasos críticos como: (Celik y Calik, 2011)

- a. Tener en cuenta el origen biológico de la proteína (eucariota o procariota), sus propiedades biológicas y químicas.
- b. Selección de la cepa hospedera que permite el plegamiento correcto y modificaciones post-traduccionales.
- c. Selección de un vector adecuado (episomal o integrador) con un promotor apropiado (constitutivo, inducible o reprimible) y un marcador de selección.
- d. Optimizar el gen (uso de codones preferentes, secuencias de parada anticipadas, tipo de modificaciones postraduccionales)
- e. Fusión del gen a una etiqueta, si es necesario, para la purificación de la Pr.
- f. Elección de la secuencia señal para dirigir la Pr al destino celular deseado (intracelular o extracelular).
- g. Prevención de la escisión proteolítica del producto.
- h. Selección del bioproceso para su producción (tipo, condiciones operacionales, escala de producción, costos) y optimización de los parámetros del bioproceso (temperatura, pH, transferencia de oxígeno).
- i. Diseño del medio de fermentación (fuentes de carbono, nitrógeno, condiciones de expresión).

Para producir una proteína recombinante se requiere el uso de un sistema de expresión adecuado, el cual debe seleccionarse dependiendo de las características y las aplicaciones destinadas a la proteína y es esencial para producir cantidades suficientes de la misma. Desde hace más de 30 años la tecnología para la expresión de Pr ha presentado un desarrollo considerable (Brondyk, 2009) y diversos sistemas de expresión de Pr se han utilizado con la finalidad de obtener proteínas para uso industrial y farmacéutico. Actualmente se emplean una gran variedad de factorías celulares que van desde organismos unicelulares tales como bacterias, levaduras, hongos, células de mamíferos, plantas o insectos, hasta organismos completos como animales y plantas transgénicas (Baneyx, 1999; Andersen y Krummen, 2002; Terpe, 2006; Brondyk, 2009;).

2.1.1. Sistemas de Expresión en Bacterias

La producción de Pr en sistemas de expresión basados en bacterias se ha aplicado desde hace cerca de 30 años, la primera Pr para su uso en humanos fue la insulina humana producida en *Escherichia coli* (*E. coli*) por la empresa Genentech. Desde entonces, la genética de *E. coli* está mejor caracterizada que la de cualquier otro microorganismo. Avances recientes en el entendimiento fundamental de la transcripción, traducción y plegamiento de proteínas en *E. coli* junto con el desarrollo de mejores herramientas genéticas, están haciendo de esta bacteria una herramienta muy útil para la expresión de proteínas complejas (Baneyx, 1999; Lara, 2011; Papanephytou y Kontopidis, 2014).

El sistema de expresión de *E. coli* sigue dominando los sistemas de expresión bacterianos y es la primera opción para las investigaciones de laboratorio y el desarrollo inicial de las actividades comerciales o como un punto de referencia útil para la comparación entre las distintas plataformas de expresión (Chen, 2011). Los métodos de expresión de proteínas provenientes de genes clonados en *E. coli* han sido utilizados de manera eficaz en la purificación y el análisis funcional de éstas. Las ventajas del uso de bacterias como sistemas de expresión, es que se cuenta con gran variedad de vectores de expresión y cepas mutantes, su facilidad de manipulación y bajos costos de producción a altas densidades celulares, lo que hace de las bacterias un importante sistema de expresión de proteínas. (Choi et al., 2006).

En *E. coli*, las proteínas recombinantes son dirigidas al citoplasma o al periplasma y en menor proporción secretadas. Las proteínas dirigidas al citoplasma son las más eficientemente expresadas. Sin embargo, una desventaja de este sistema es que la elevada expresión de proteínas recombinantes puede a menudo llevar a la acumulación de agregados de proteínas insolubles que forman cuerpos de inclusión. Otra desventaja de este sistema de expresión es que las proteínas glicosiladas requieren de la maquinaria de glicosilación, la cual no está presente en bacterias, además se presentan secreciones ineficientes de proteínas al medio de cultivo y se generan endotoxinas perjudiciales para la salud humana y animal (Choi et al., 2006).

Se han investigado otros sistemas de expresión en bacterias como: *Lactis Lactococcus* que ha surgido en los últimos años como un importante sistema de expresión en bacterias gram-positivas, en comparación con *E. coli*, tiene la ventaja de ser microorganismos reconocidos como seguros (GRAS) y libre de endotoxinas es

importante tanto para las aplicaciones terapéuticas como alimentarias. Como Gram-positivo, tiene la ventaja de permitir una producción extracelular de la proteína recombinante (Chen, 2011). La bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis* se ha utilizado en la producción de proteasas y algunas vitaminas ya que carecen de membrana externa permitiendo secretar una gran cantidad de proteínas al medio extracelular (Lara, 2011).

2.1.2. Sistemas de Expresión en Levaduras

Los sistemas de expresión de proteínas en levaduras han demostrado ser una fuente eficiente y económica de proteínas de eucariotes superiores de interés industrial o académico. Las levaduras ofrecen un ambiente apto para el plegamiento de proteínas eucarióticas, llevan a cabo modificaciones postraduccionales y pueden secretar las proteínas recombinantes al medio de cultivo. Tienen muchas de las ventajas de los microorganismos al ser unicelulares, de fácil manipulación y rápido crecimiento. Además tienen una organización celular eucariótica que permite la realización de procesos de expresión y maduración parcialmente similares a las células animales y vegetales, lo cual les da la ventaja para la producción de proteínas de origen eucariota.

Actualmente las levaduras son los sistemas de expresión más utilizados para la producción de proteínas recombinantes, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) fue el primer y mejor caracterizado sistema de expresión de proteínas en levaduras, desarrollada en los años 80 con su uso tradicional en horneado de pan y en la preparación y elaboración del vino (Corchero et al., 2013). En los últimos años, levaduras diferentes a ésta, como las metilotróficas *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*, la levadura de gemación *Kluyveromyces lactis*, la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, y dos levaduras dimórficas *Arxula adenivorans* y *Yarrowia lipolytica*, han emergido como alternativas con aplicaciones potenciales en la industria biotecnológica y farmacéutica. (Cregg, 1993; Andersen y Krummen, 2002; Celik y Calik, 2011).

Los sistemas basados en levaduras ofrecen varias ventajas respecto a otros hospederos, como manipulación sencilla a nivel de laboratorio y de la industria, producción de altos niveles de la Pr, realiza modificaciones postraduccionales, medios de cultivo baratos y formulados libres de tóxicos, bajos niveles de secreción de

proteínas endógenas, entre otras. No obstante; numerosos casos de inestabilidad de los plásmidos, baja producción de proteínas y la hiperglicosilación de proteínas han limitado el número de productos comerciales en el mercado.

2.1.3. Sistemas de Expresión en Cultivo de Células Animales

Las líneas celulares procedentes de mamíferos tales como fibroblastos y células de ovario de hámster chino (CHO), son los mejores sistemas de expresión para proteínas de organismos superiores como las proteínas humanas, son utilizados debido a las ventajas que poseen para la producción de proteínas recombinantes como la presencia de mecanismos moleculares necesarios para realizar modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, fosforilaciones, procesamiento proteolítico, todas ellas similares a las transformaciones postraduccionales que las proteínas humanas sufren en sus fuentes naturales. La expresión en células de mamíferos ha sido el sistema de producción de Pr más utilizado. Por ello más de la mitad de los productos biofarmacéuticos que hay en el mercado y varios cientos de proteínas recombinantes que se encuentran en desarrollo clínico, se han obtenido utilizando esta factoría celular.

A nivel bioindustrial los métodos de expresión utilizando células de mamíferos han sido considerados sistemas menos eficientes para expresar proteínas recombinantes, debido a las desventajas asociadas al sistema como la manipulación, el tiempo de duplicación de las células, los costos de cultivo y el bajo rendimiento de la proteína expresada. esto es un inconveniente para su uso en la producción de proteínas a escala comercial; sobre todo si tienen que competir con productos naturales de relativo bajo costo, como por ejemplo enzimas de aplicación en biocatálisis de productos químicos; unido a esto, otra desventaja de emplear líneas celulares de organismos superiores son los posibles riesgos biológicos que ello implica como la transmisión de enfermedades contagiosas y la antigenicidad (Andersen y Krummen, 2002; Brondyk, 2009; Zhu, 2011; Assenberg et al., 2013).

2.1.4. Otros Sistemas de Expresión

Las plantas pueden ser empleadas como biorreactores para la producción de diversas proteínas, representan un buen modelo gracias a sus bajos costos, estabilidad de la proteína, tiempos de producción, fácil escalamiento y obtención del producto recombinante. La producción de proteínas recombinantes en plantas implica el uso de la biotecnología a diversos niveles incluyendo métodos de transformación, control de expresión genética, expresión en diversas plataformas, selección de la proteína a expresar, su acumulación, mantenimiento y estabilidad. Todo esto hace parte de una nueva rama de la biotecnología conocida como “*Plant molecular farming*.” A partir de los años 80, con la producción de las primeras plantas transgénicas de tabaco se forjaron los inicios de la tecnología del ADNr en plantas dando vía a la producción en 1986 y 1989 de la hormona de crecimiento humana y el primer anticuerpo en plantas transgénicas de tabaco. Estos resultados mostraron que las plantas pueden ensamblar varios complejos multiprotéicos funcionales, manteniendo su autenticidad estructural. En 1997 se produjo la primera proteína de alto valor comercial, la avidina, expresada en maíz transgénico. Desde entonces las ventajas y posibilidades de la tecnología han brindado nuevas oportunidades para la producción de un sinnúmero de compuestos de importancia clínica e industrial (García, 2010). La gran desventaja a nivel industrial de este sistema es que todavía los niveles de expresión son muy bajos para que la producción resulte rentable.

La expresión mediada por **baculovirus** en células de insectos ofrece otra herramienta útil para la generación de proteínas recombinantes. El baculovirus es un virus lítico, grande, con ADN bicatenario, es rutinariamente amplificado en líneas celulares de insectos derivadas a partir del cogollero de maíz *Spodoptera frugiperda*, la producción de proteínas recombinantes es completada en las células del organismo antes mencionado o en una línea celular derivada de la lanzadera de repollo *Trichoplusia ni*. Originalmente, la creación de baculovirus recombinante involucra la cotransfección del gen de interés flanqueado por la secuencia del baculovirus con ADN del baculovirus dentro de células de insectos, y el tamizaje para eventos raros de recombinación homóloga (Andersen y Krummen, 2002). La expresión mediada por baculovirus es usada rutinariamente para producir proteínas recombinantes tanto citoplasmáticas como secretadas. La secreción eficiente generalmente requiere la presencia de un péptido señal. La desventaja de este sistema es que las células de insectos están generalmente creciendo en medio conteniendo suero lo cual complica la purificación de la proteína secretada (Brondyk, 2009), además una complicación

adicional es que la infección por baculovirus puede tener un impacto negativo en las funciones de procesamiento de proteínas del huésped (Jarvis, 2009; Assenberg et al., 2013).

Otros problemas reportados son, por ejemplo, el proceso de infección lítica provoca la liberación de proteasas virales y del huésped las cuales pueden impactar sobre la calidad de la proteína. Ciertas proteínas virales pueden impedir la vía secretoria y repetidas rondas de amplificación del virus tienden a producir partículas defectuosas que reducen el rendimiento de la Pr. El procesamiento incompleto de una proteína precursora es otro fenómeno observado probablemente debido a la pérdida de actividad de la proconvertasa en células de insectos infectadas (Jarvis, 2009; Assenberg et al., 2013).

2.2. *Pichia pastoris* como Sistemas de Expresión de Proteínas

Durante los primeros años de la década de los 70, la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) fue desarrollada por la Phillips Petroleum Company, como una herramienta biológica para convertir el metanol (producto de desecho de la industria del petróleo y una fuente de carbono barata), en proteína de alta calidad para la industria de alimento del ganado. La combinación de la crisis del petróleo, la imposibilidad de competir con los bajos costos de los productos de la soja como alternativa a alimento de ganado y la emergente industria de la biotecnología llevó a buscar otros usos potenciales para *P. pastoris*. A mitad de los años 80, el interés sobre *P. pastoris* se enfocó hacia el uso de esta levadura como una factoría celular eucariota, para producir grandes cantidades de proteínas heterólogas de interés para la biotecnología, incluida la industria farmacéutica (Gould et al., 1992).

P. pastoris es un organismo eucariota, unicelular, que tiene la ventaja de la facilidad y bajos costos de manipulación. El éxito y la rápida introducción de *P. pastoris* en la comunidad científica general como un sistema de expresión de proteínas heterólogas es el resultado de varios factores importantes, incluyendo que es un sistema de producción en un organismo unicelular, es útil como un modelo de organismo eucariota para estudios de biología molecular y celular, posee similitud biológica y tecnológica con el mejor sistema de expresión en levaduras de la biología moderna, *S. cerevisiae* (Sreerishna et al., 1997). *Pichia* posee las características de los sistemas de expresión eucariotas, como el procesamiento proteolítico de las

proteínas, el plegamiento y otras modificaciones postraduccionales. Esto hace que sea más fácil, rápido y barato producir proteínas en *P. pastoris* que en otros sistemas eucariotas, además de obtener altos niveles de expresión (Gellissen, 2000; Damasceno et al., 2012).

2.2.1. Promotores

P. pastoris es una levadura metilotrófica facultativa perteneciente al grupo de los *Ascomycetes*, se reproduce por gemación, es homotética y su dotación genómica permanece haploide. La característica principal que hace a esta levadura de gran valor es la existencia de un promotor con un elevado nivel de transcripción y altamente regulable denominado promotor de la alcohol oxidasa (P_{AOX}). Existen promotores alternativos debido a que el promotor P_{AOX} a pesar de ser útil para expresar numerosos genes foráneos, hay circunstancias en las cuales puede no ser adecuado porque el metanol es potencialmente peligroso, especialmente en cantidades necesarias para fermentaciones a gran escala. Por lo tanto, promotores que no son inducidos por metanol son atractivos para la expresión de ciertos genes. Para la expresión de Pr, varios promotores fuertes o débiles de *P. pastoris* pueden ser utilizados. Estos promotores son inducibles o constitutivos. La expresión con promotores inducibles es muy favorable ya que permite el control de las condiciones experimentales antes de iniciar la expresión, lo cual reprime la expresión de proteínas que son tóxicas para el huésped (Spohner et al., 2015).

Estos promotores alternativos se clasifican en inducibles como el aldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FLD1), Proteína de la matriz peroxisomal útil para la biogénesis de peroxisomas (PEX8), promotor del gen del tiocitrato liasa (ICL1), y promotores constitutivos como Gliceraldehído 3P deshidrogenasa (GAP), enzima glicolítica fosfoglicerato quinasa (PGK1), factor 1- α de elongación de la translación (TEF1) y GTPasa involucrada en secreción (YPT1) (Cereghino y Cregg, 2000; Potvin et al., 2012).

También se destaca que *P. pastoris* es un microorganismo preferentemente respirativo, lo que evita la generación de subproductos indeseables típicos de procesos fermentativos y facilita su cultivo a elevadas densidades celulares. Cerca de 1000 proteínas han sido clonadas y expresadas usando este sistema y ha sido seleccionada por varias plataformas de producción de proteínas para programas de genómica estructural (Damasceno et al., 2012).

2.2.2. Promotor de la Alcohol Oxidasa

La alcohol oxidasa es un homo-octámero, en la que cada subunidad contiene un enlace no covalente de nucleótidos de flavina (FAD) como cofactor, esta enzima tiene una pobre afinidad por el oxígeno y *P. pastoris* compensa esto produciendo grandes cantidades de la enzima. Hay dos genes en *P. pastoris* que codifican para la alcohol oxidasa, AOX1 y AOX2, sin embargo, el gen AOX1 es responsable por la mayor parte de la actividad alcohol oxidasa. La secuencia de nucleótidos codificante para alcohol oxidasa es homóloga en un 92% entre AOX1 y AOX2. La proteína generada por cada uno comparte una homología del 95% en cuanto a composición aminoacídica y del 97% en cuanto a actividad específica (Koutz et al., 1989).

La regulación del gen AOX1 implica dos pasos, un mecanismo represión/derepresión, por catabolito y uno de inducción específica por sustrato. La pérdida del gen AOX1 (por ejemplo en los eventos de transformación de la levadura por integración del plásmido) y por lo tanto la pérdida de la actividad de la alcohol oxidasa resulta en una cepa que es fenotípicamente Mut^s (utilización lenta de metanol), este se traduce en una reducción muy importante de la levadura para utilizar metanol y por lo tanto se observa un crecimiento muy pobre de las células. El fenotipo Mut⁺, es el fenotipo nativo y capacita a las células para crecer en medio con metanol. Existe un tercer fenotipo el cual tiene delección de los genes AOX por lo cual es incapaz de crecer sobre metanol (Mut⁻, fenotipo con negativa utilización de metanol) (Zalai et al., 2012; Spohner et al., 2015).

El promotor del gen P_{AOX1} ha sido empleado para dirigir la expresión de genes de interés que codifican para una proteína deseada (Cereghino y Cregg, 2000). Las secuencias de ADN de los vectores de expresión de *P. pastoris* poseen un promotor de transcripción, uno o varios sitios de restricción, una secuencia terminal 3' propia de *Pichia*, un marcador de selección y una secuencia de replicación y selección propias de *E. coli*. La mayoría de estos vectores son integrativos, los cuales pueden siempre integrarse en el cromosoma en forma replicativa. Las integraciones pueden ser sitio dirigidas al gen HIS4 o al sitio primario de AOX1. *P. pastoris* también contiene un gen de alcohol oxidasa secundario AOX2, permitiendo el crecimiento sobre metanol aun cuando el gen AOX1 esta desplazado por integración del vector (Sreekrishna et al., 1997). Actualmente la lista de vectores de expresión desarrollados en *P. pastoris* es

mayor, según aumentan los estudios de aislamiento de genes y marcadores alternativos en este microorganismo, para mayor información se puede encontrar una lista de algunos de ellos en Cereghino y Cregg, (2000), y Spohner et al., (2015).

2.2.3. Metabolismo del metanol en *P. pastoris*

En la figura 2.1 se observan las principales reacciones involucradas en el metabolismo del metanol en *P. pastoris* y en levaduras metilotróficas en general. La oxidación completa del metanol a CO₂ y H₂O en microorganismos metilotróficos engloba tanto vías disimilatorias (generación de energía), como vías asimilatorias (biosíntesis de material celular).

El proceso para que se lleve a cabo la vía disimilatoria se realiza en dos etapas: (los números en superíndice señalan la ubicación en el gráfico)

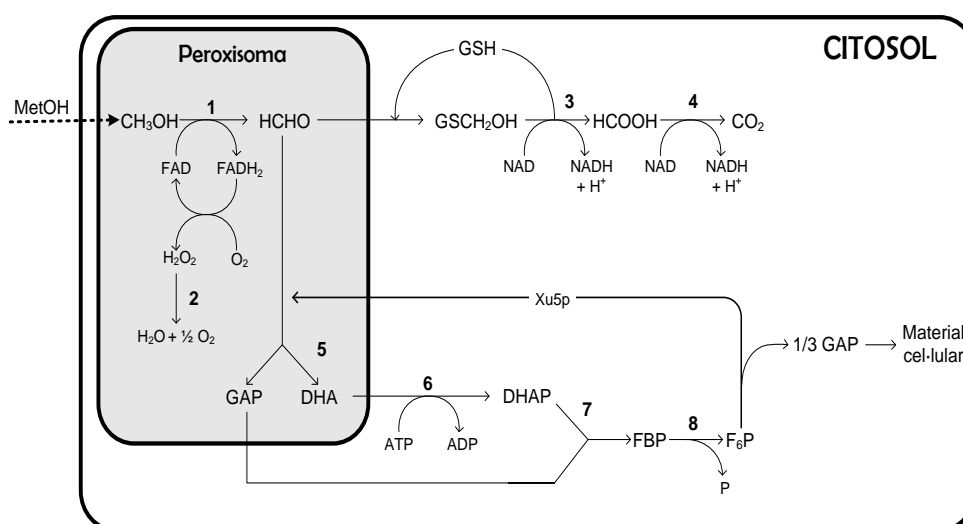


Figura 2.1 Vía del metabolismo del metanol y su compartimentalización en levaduras metilotróficas.

Enzimas: 1) alcohol oxidasa (AOX), 2) catalasa, 3) formaldehído dehidrogenasa (FLD), 4) formato dehidrogenasa (FMD), 5) dihidroxiacetona sintasa (DAS), 6) dihidroxiacetona kinasa, 7) fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, 8) fructosa-1,6-bisfosfotasa (Zhang, 2000).

La primera etapa consiste en la oxidación del metanol a formaldehído, esta reacción ocurre en el interior de los peroxisomas, de esta reacción no hay desprendimiento energético para la célula, es catalizada por la enzima alcohol oxidasa¹ la cual requiere de la presencia de metanol y oxígeno molecular, de esta actividad se genera formaldehído y peróxido de hidrógeno como productos. La segunda etapa continúa cuando el formaldehído es transportado al citosol para su oxidación, las enzimas que catalizan estas reacciones son la formaldehído³ y la formato deshidrogenasa⁴ dependientes de NAD⁺. Las levaduras metilotróficas obtienen

energía para su actividad celular mediante la oxidación del $\text{NADH}+\text{h}^+$ generado (Cereghino y Cregg, 2000).

Siguiendo con la vía de asimilación del metanol esta inicia cuando el formaldehído remanente es asimilado y convertido en dihidroxiacetona (DHA) y gliceraldehído fosfato (GAP) por la acción de la dihidroxiacetona sintasa⁵. La DHA es liberada al citosol y fosforilada por la dihidroxiacetona kinasa⁶ para formar DHAP; esta molécula puede experimentar dos reacciones, la reacción de interconversión de triosas fosfatos para formar GAP gracias a la acción de la enzima triosa fosfato isomerasa y alimentar la segunda fase de la vía glucolítica; la otra reacción es la condensación con una molécula de GAP para formar fructosa 1,6-bifosfato (1,6 FBP) y luego fructosa 6-fosfato (F6P), en estas transformaciones intervienen las enzimas fructosa 1,6-bifosfato aldolasa⁷ y fructosa 1,6-bifosfatasa⁸, esta última hace parte del proceso conocido como gluconeogénesis (GAO y Shi, 2013).

2.2.4. Metabolismo del glicerol en *P. pastoris*

En cultivo estándar con cepas de *P. pastoris* recombinante para la producción de proteínas foráneas con inducción por metanol, *P. pastoris* está usualmente creciendo primero sobre glicerol como fuente de carbono, ya que la producción de biomasa y la máxima velocidad específica de crecimiento son mayores creciendo en glicerol que en metanol. Por otra parte, durante el crecimiento sobre glicerol, la expresión de la proteína recombinante es reprimida, lo que evita la selección de los mutantes que no expresa durante la generación de biomasa.

En la figura 2.2 se observan las principales reacciones involucradas en el proceso de metabolismo del glicerol en *P. pastoris* y en levaduras metilotróficas en general. Una vez que el glicerol entra a la célula es fosforilado por la glicerol quinasa para formar glicerol 3-fosfato (G3P), posteriormente ocurre la oxidación del G3P a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) debido a la acción de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD (E.C.1.1.99.5) localizada sobre la superficie externa de la membrana mitocondrial interna. Finalmente la DHAP ingresa a la segunda fase de la vía glicolítica y se obtiene el ácido pirúvico. Posteriormente el piruvato es oxidado a acetil-CoA y alimenta el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) de donde se obtienen GTP, $\text{NADH}+\text{H}^+$ y FADH_2 , estos dos últimos serán utilizados

posteriormente para generar ATP a través de la cadena de transporte electrónico y fosforilación oxidativa (Yurimoto et al., 2011).

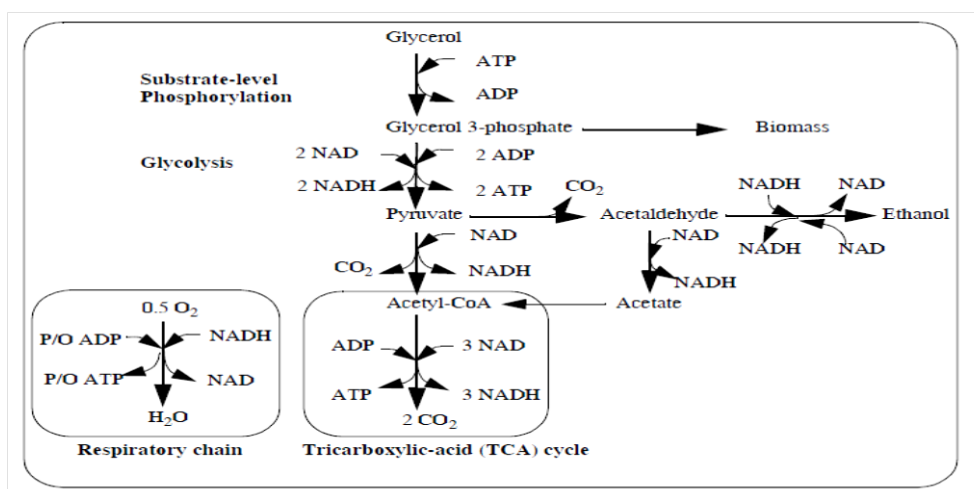


Figura 2.2: Metabolismo simplificado del glicerol en *P. pastoris* (Ren et al., 2003).

La fermentación alcohólica a partir de piruvato puede ser desencadenada por una limitación en la capacidad respiratoria y/o por una limitación en el bypass de la piruvato deshidrogenasa (conversión de acetaldehído a acetato). En esta derivación fermentativa, el piruvato se convierte en acetaldehído por la piruvato descarboxilasa y además se reduce a etanol mediante el alcohol deshidrogenasa. El etanol también se puede usar como un sustrato, si se eliminan las limitaciones mencionadas anteriormente. En este caso, el etanol se oxida a acetaldehído, a continuación, a acetato, y finalmente se convierte en acetil-CoA por la acetil-CoA sintetasa. Sin embargo, de acuerdo con Ren et al., (2003), la concentración de etanol residual medida durante el crecimiento con glicerol es insignificante.

2.2.5. Producción de proteína heterólogas en *P. pastoris*

El sistema de expresión en *P. pastoris* se ha convertido en uno de los más utilizados para la expresión de proteínas heterólogas de eucariotas, ha demostrado ser una alternativa eficiente al uso de *S. cerevisiae* como sistema clásico de expresión de proteínas heterólogas por diferentes factores, entre los más importantes se destacan:

- La levadura *P. pastoris*, es un microorganismo unicelular de fácil manipulación y cultivo. Presenta características similares con respecto a las técnicas de manipulación genética de *S. cerevisiae*, permitiendo la aplicación de las mismas.

- Se consiguen grandes niveles de expresión de proteínas heterólogas intra y extracelulares en medios sintéticos y baratos.
- Tiene un fuerte promotor derivado del gen de la alcohol oxidasa 1 (P_{AOX1}), de fácil manipulación, eficiente e inducible por metanol y fuertemente reprimido por otras fuentes de carbono, como la glucosa o el glicerol. Esta es una de las principales propiedades que justifican el éxito de *P. pastoris*.
- Al tratarse de un microorganismo eucariota proporciona un gran número de ventajas, ya que es capaz de realizar modificaciones postraduccionales de las proteínas expresadas (plegamiento, enlaces disulfuros, glicosilación, etc).
- Es una levadura con un metabolismo fundamentalmente respiratorio, característica que facilita el desarrollo de cultivos a elevadas densidades, en comparación con levaduras fermentativas.
- No produce fenómenos de hiperglicosilación de las proteínas eucariotas superiores, en contraste con *S. cerevisiae*, disminuyendo las posibles respuestas inmunogénicas de los organismos en donde se han de aplicar.
- Al tratarse de un microorganismo haploide cualquier modificación genética se manifiesta fenotípicamente en generaciones posteriores.
- Prácticamente no excreta proteínas nativas al medio extracelular, facilitando de esta forma la recuperación y posterior purificación de las proteínas producidas (cuando la expresión es extracelular).
- Este sistema de expresión de proteínas tiene éxito ya que se caracteriza por ser un método rápido, fácil y económico (Invitrogen, 2012) comparado con el sistema de expresión de eucariotes superiores, como células de insectos o mamíferos.

El sistema de expresión de *P. pastoris* ha ganado aceptación como un organismo huésped importante para la producción de proteínas foráneas. En el año 2000, eran ya más de 400 tipos de proteínas heterólogas expresadas con éxito en *P. pastoris*. Este número se ha incrementado enormemente durante los últimos años, es de destacar que del elevado número de proteínas expresadas se encuentra una gran diversidad desde proteínas virales hasta humanas, pasando por proteínas de bacterias,

levaduras, hongos, plantas, animales invertebrados y vertebrados como se puede apreciar en el trabajo publicado por Cereghino y Cregg, (2000) y Spohner et al., (2015).

2.3. Lipasas

2.3.1. Estructura y Función

Las lipasas comprenden un grupo de enzimas hidrolíticas de amplia y extendida presencia en el reino animal y vegetal. Una lipasa (Glicerol éster hidrolasa ó acilglicerol acilhidrolasa EC 3.1.1.3) está definida como una carboxipeptidasa, la cual cataliza la hidrólisis y síntesis de acilglicérols de cadena larga con trioleoilglicerol como sustrato estándar. Las aplicaciones biotecnológicas de lipasas a menudo sugiere una demanda de técnicas para determinar no solo su actividad, sino también su estereoselectividad al sustrato; sin embargo, no existe un método universal que permita la determinación simultánea de estas propiedades (Rohit et al., 2001).

La función biológica de las lipasas (Figura 2.3) es catalizar la hidrólisis de triglicéridos, produciendo ácidos grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos y glicerol. Las aplicaciones de las lipasas son múltiples y variadas, originalmente se han utilizado para la hidrólisis de grasas y aceites, aunque también son capaces de llevar a cabo el proceso inverso, debido a que pueden sintetizar enlaces éster. Además las lipasas catalizan reacciones de transesterificación e interesterificación. Debido a su estereoespecificidad, el potencial biotecnológico de las lipasas es enorme y despiertan un elevado interés en la industria alimentaria, agrícola, química, farmacéutica, clínica y cosmética, entre otros muchos sectores. En la industria química, las lipasas se han utilizado en la composición de detergentes, o para la síntesis orgánica (síntesis de compuestos ópticamente activos), de gran interés en el área farmacéutica (Ferreira-Dias et al., 2013; Spohner et al., 2015).

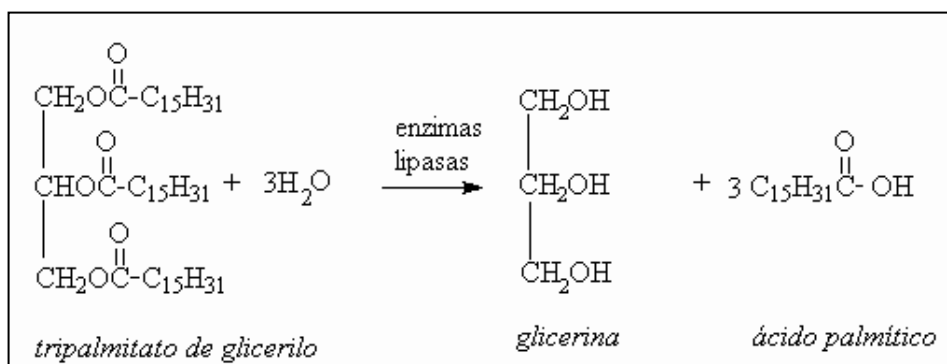


Figura 2.3 Mecanismo de acción de las lipasas

Hace casi 100 años que el microbiólogo C. Eijkmann reportó que varias bacterias podrían producir y secretar lipasas. Cuando fue aceptado que las lipasas permanecen enzimáticamente activas en solventes orgánicos, los investigadores empezaron a desarrollar estas enzimas como herramienta ideal para la química orgánica debido a sus múltiples propiedades como son: La quimio, regio y estereoselectividad; además, están disponibles en grandes cantidades debido a que muchos de ellos pueden ser producidos a partir de microorganismos, principalmente hongos y bacterias. Además, la estructura cristalina de muchas lipasas han sido resueltas facilitando considerablemente el diseño de estrategias en ingeniería de procesos y finalmente, estas enzimas no requieren cofactores ni catalizan reacciones laterales. Estas propiedades hacen de las lipasas un grupo muy amplio y útil de biocatalizadores en química orgánica (Jaeger y Eggert, 2002; Hasan et al., 2006).

2.3.2. Aplicaciones Biotecnológicas de las Lipasas

Muchas aplicaciones biotecnológicas han sido establecidas utilizando lipasas para la síntesis de nuevos materiales biopoliméricos como polifenoles, polisacáridos y poliéster, que muestran un grado considerable de diversidad y complejidad, estos compuestos están recibiendo un notable grado de interés debido a que son biodegradables y producidos a partir de recursos naturales renovables (Jaeger y Eggert, 2002).

Entre las utilidades más sobresalientes de las lipasas en la industria se encuentra la producción de compuestos enantioméricamente puros como agroquímicos, saborizantes y farmacéuticos (Hasan et al., 2006). Las lipasas se han

utilizado para obtener una fuente alternativa de energía para el transporte público, el llamado biodiesel, el cual ha sido producido químicamente usando aceites vegetales y animales haciendo una conversión a metilester o a ésteres de alcohol de cadena corta (Jaeger y Eggert, 2002; Ferreira-Dias et al., 2013).

Las principales reacciones lipolíticas que tienen aplicación industrial y que comienzan a sustituir a los procesos químicos convencionales son: Síntesis de triglicéridos, hidrólisis de aceites vegetales, biomodificaciones de aceites y grasas, preparación resolutiva de ácidos y alcoholes racémicos, síntesis de precursores de péptidos, hidrólisis de grasas animales, síntesis de péptidos. Las industrias que se pueden beneficiar de estas enzimas son la industria oleoquímica, industria alimentaria, aplicaciones analíticas, producción de biosurfactantes, fabricación de detergentes, industria farmacéuticas, entre otros (Schmidt-Dannert, 1999; Sharma et al., 2001; Fickers et al., 2011; Tecelão et al., 2012).

2.3.3. Lipasa de *Rhizopus oryzae*

El hongo *R. oryzae* es una cepa lipolítica cuyo hábitat natural es el fruto de la palma, de este hongo se ha aislado una lipasa extracelular conocida bajo la abreviatura de ROL (lipasa de *R. oryzae*). La síntesis de lipasas es una característica común en las distintas especies del género *Rhizopus*. Se han descrito hasta 30 lipasas diferentes sintetizadas por las distintas especies de este hongo, cuya principal aplicación es la modificación de lípidos. Las lipasas sintetizadas por las distintas especies de *Rhizopus* difieren básicamente en ciertos aminoácidos. Por ejemplo, la lipasa de *R. oryzae* (ROL) se diferencia de las de *R. niveus* (RNL), *R. delemar* (RDL) y *R. javanicus* (RJL) en la sustitución de los grupos His 134 y Ile 234 por Asn y Leu, respectivamente. Las diferentes formas de lipasa derivadas de *Rhizopus* sp. son resultado de distinto procesamiento proteolítico de un mismo gen, dando lugar a diferencias respecto a la estructura tridimensional de la enzima, que se traducen en una diferente especificidad respecto a la longitud de las cadenas de los ácidos grasos que reconocen (Minning et al., 1998; Beer et al., 1998).

El gen que codifica para la lipasa extracelular de *R. oryzae* comprende una secuencia señal de 26 aminoácidos, una prosequencia de 97 aminoácidos y la región de la lipasa madura de 269 aminoácidos (Beer, 1998). La lipasa extracelular nativa de *R. oryzae* posee un peso molecular de 32 kDa, cuatro sitios potenciales de N-

glicosilación y tres puentes disulfuro en su estructura final. La enzima nativa purificada es estable en el rango de pH 4.5 a 7, a 30°C y un pH óptimo de actividad de 8.5.

Hiol et al., (2000) purificaron una lipasa extracelular producida por *R. oryzae* por precipitación con sulfato de amonio, cromatografía sulfopropil sefarosa, filtración en gel sefadex G-75, y un segundo paso de cromatografía en sulfopropil sefarosa. La enzima purificada tenía una masa molecular de 32 kDa por análisis SDS-PAGE y filtración en gel, con un punto isoeléctrico de 7.6.

La expresión heteróloga de la lipasa madura de *R. oryzae* fue realizada por primera vez en células de *E. coli*, aunque resultó en la formación de cuerpos de inclusión que incrementan los costos debido al proceso de purificación. En el mismo trabajo, también se comprobó que la ROL madura posee cierta actividad fosfolipasa, por lo que la expresión de la enzima madura resultó tóxica para la célula. La expresión de la lipasa junto con su prosecuencia no mostraba estas propiedades, debido a que la prosecuencia modula la actividad y el correcto plegamiento de la ROL en *E. coli*. Resultados similares se encontraron en la expresión de ROL y proROL en *S. cerevisiae*. Aunque los niveles de expresión aún siguen siendo bajos (Takahashi et al., 1998).

2.3.4. Producción de ROL en *P. pastoris*

Minning et al., (1998), realizaron la construcción de la cepa de *P. pastoris*, que contiene el gen ROL, bajo el control del P_{AOX1} , con lo que en este sistema la expresión de la lipasa es, por lo tanto, dependiente de la inducción por presencia de metanol. La cepa utilizada para la construcción es auxotrófica para el aminoácido histidina, por lo que la producción de la enzima se realizó utilizando un medio de cultivo de composición compleja y operando en la modalidad de semicontinuo (*fed-batch*).

En el mismo trabajo realizaron por primera vez la expresión extracelular de la ROL madura en la levadura metilotrófica *P. pastoris* obteniendo niveles de producción satisfactorios (60 mg/L), y propiedades similares a las descritas para la ROL nativa. La ROL recombinante obtenida bajo este sistema de expresión posee un peso molecular de 30 kDa, un pH óptimo de actividad de 8.1 a 30°C y un punto isoeléctrico ≥ 9.3 .

La velocidad específica de crecimiento de la cepa salvaje es superior a la cepa que contenía el gen de la ROL. Esta variación se atribuye al posible efecto tóxico de la expresión de la ROL sobre el crecimiento celular, debido a la posible actividad de la fosfolipasa de la expresión recombinante de la enzima madura, como había sido observado previamente en *E. coli* (Beer et al., 1998).

Serrano et al., (2001), comparan el crecimiento de la cepa X33/ROL (Mut^+ singlecopy) con las cepas comerciales control GS115 y KM71 (Mut^+ y Mut^s respectivamente) que no contienen el gen de ROL. Se realizaron una serie de cultivos en erlenmeyer utilizando un medio mínimo (BMM) con metanol como única fuente de carbono y sustrato inductor. Estos experimentos demuestran que la velocidad específica de crecimiento de la cepa X33/ROL era superior a la cepa control de Mut^s (KM71), como era de esperar, por las características fenotípicas de cada cepa.

En cuanto a la utilización del promotor P_{AOX1} se ha trabajado con la comparación entre diferentes fenotipos: Las cepas Mut^+ y Mut^s , que se diferencian entre sí por la capacidad de asimilación de metanol que presentan. Cos et al., (2005), estudian el efecto del fenotipo en la producción de la ROL, demostrando que pese a que la cepa Mut^+ presentaba mejores valores de productividad, trabajar con la cepa Mut^s presenta más ventajas operacionales ya que simplifica el control de la operación. El consumo de metanol por parte de la cepa Mut^s es menor y presenta tendencias más suaves, de esta manera el control de la consigna de metanol en el medio de cultivo a través del caudal de alimentación de metanol se simplifica. La cepa Mut^+ presenta valores de velocidad de consumo de metanol más grande y controlar la consigna de metanol en el medio requiere métodos en línea de la medida de metanol y una respuesta rápida del sistema de control.

En este mismo trabajo (Cos et al., 2005), se estudió el efecto de aumentar el número de copias del gen de interés sobre la productividad del proceso. En ambos fenotipos estudiados, aumentar el número de copias tiene un efecto negativo en la producción de ROL con el sistema *P. pastoris*.

Posteriormente también se demuestra que el control de la concentración de metanol mediante un analizador en línea y una estrategia de control PI combinada con un modelo de consumo, permite optimizar la fase de inducción y mejora la productividad con respecto a la utilización de las medidas *off-line* por cromatografía de gases (Cos et al., 2006).

Ramón et al., (2007), realizan una primera aproximación para la producción de ROL utilizando el fenotipo Mut^s de *P. pastoris*, aplicando una estrategia en semicontinuo con la utilización de sustratos mixtos (sorbitol-metanol), obteniendo productividades más elevadas que las alcanzadas utilizando el metanol como única fuente de carbono.

En el 2010-2011, Arnau et al., realizan un estudio sistemático del efecto de la concentración de metanol y la velocidad específica de crecimiento sobre la producción de la ROL en cepas Mut^s de *P. pastoris* utilizando sustratos mixtos sorbitol-metanol y glicerol-metanol. Arnau reporta que el parámetro clave en la producción de ROL es el *set-point* de metanol seleccionado, con una concentración óptima de metanol de 2 g/L, la producción y el rendimiento producto biomasa son más altos utilizando sustratos mixtos en vez de metanol como única fuente de carbono. De otra parte, al comparar la utilización de glicerol y sorbitol como cosustrato, se concluyó que el glicerol presentó menor rendimiento que el sorbitol en términos de productividad específica y rendimiento $Y_{p/x}$, pero la productividad y la actividad lipolítica máxima fueron muy similares para los dos cosustratos (Arnau et al., 2010; Arnau et al., 2011).

Barrigón et al., (2013), comparan dos estrategias de cultivo operacionales en la producción de ROL por *P. pastoris* fenotipo Mut⁺, utilizando cultivos con metanol limitante y no limitante, concluyendo que existe un efecto inhibitorio del metanol sobre el crecimiento celular, así como una lentitud en la producción de ROL durante la fase temprana de la inducción. Los mejores valores de producción total de la ROL, $Y_{p/x}$, productividad volumétrica y específica y q_p se obtuvieron al utilizar una concentración de metanol constante a 3 g/L. Menores concentraciones de metanol resultan en baja acumulación del producto, mientras que la mayor concentración de metanol (10 g/L) utilizada presenta inhibición del crecimiento de la cepa.

2.4. Glicerol crudo de Biodiesel como sustrato

2.4.1. Biodiesel

La necesidad de usar una tecnología de producción más limpia está incrementando globalmente. La necesidad de una alternativa para el combustible fósil en años recientes ha generado una investigación extensiva. Los combustibles fósiles son fuente de energía no renovable la cual genera contaminantes que están

vinculados al calentamiento global, el cambio climático y a algunas enfermedades incurables. Los inminentes retos y las implicaciones ambientales de combustible fósil se han revisado ampliamente en la literatura (Muthu et al., 2010). De igual manera el biodiesel ha sido identificado como una de las opciones para complementar los combustibles convencionales, la producción de biodiesel a partir de fuentes biológicas renovables tal como aceites vegetales y grasas animales también se han revisado ampliamente en la literatura (Aransiola et al., 2013).

El continuado e incrementado uso de petróleo puede intensificar la contaminación del aire local y magnificar el problema de calentamiento global causado por el CO₂. El combustible biodiesel tiene el potencial de reducir el nivel de contaminación y el nivel de potenciales o probables carcinógenos, en la figura 2.4 se esquematiza de manera general el proceso de producción de biodiesel.

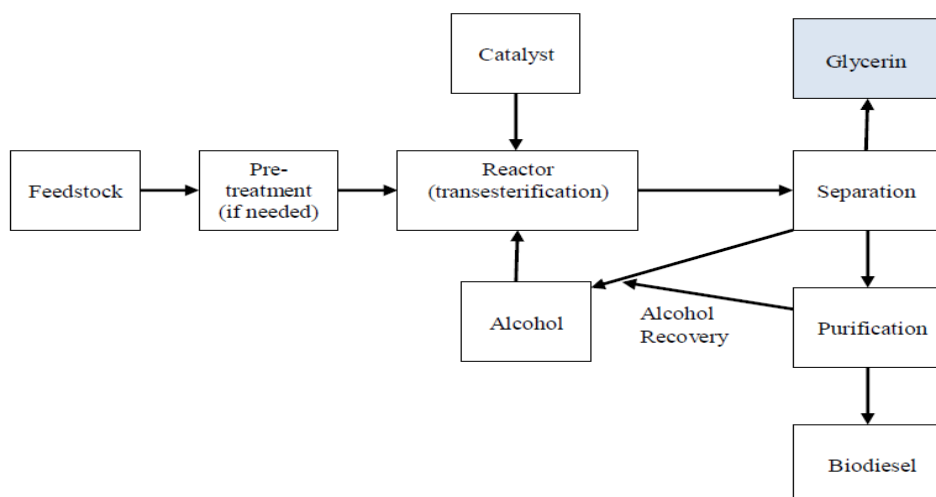


Figura 2.4: Esquema del proceso de producción de biodiesel (Tomado de Shafer et al., 2007).

Los aceites refinados y grasas contienen pequeñas cantidades de ácidos grasos y agua, lo cual tiene efecto significativo sobre la transesterificación de glicéridos con alcoholes usando catálisis ácida o alcalina, también interfieren en la separación de éster de ácidos grasos y glicerol. Las ventajas de aceites vegetales como combustible radican en que el punto de inflamación del biodiesel es significativamente más alto que el diésel de petróleo o la gasolina por lo que es uno de los combustibles más seguros disponibles, en la fácil disponibilidad y renovabilidad. Las desventajas se caracterizan en su alta viscosidad, baja volatilidad, la reactividad de las cadenas carbonadas insaturadas. Los problemas con este tipo de aceites aparecen solo después de que el motor ha estado operando sobre aceites vegetales por largos periodos de tiempo, especialmente con máquinas de inyección directa. Los

problemas incluyen depósitos de carbono, adición de anillos espesante y gelificación del aceite lubricante como un resultado de la contaminación por aceites vegetales.

El uso directo de aceites vegetales y sus mezclas como combustible en motores diésel se ha considerado insatisfactorio y poco práctico, principalmente debido a la alta viscosidad, la composición de ácido, el contenido de ácidos grasos libres de tales aceites, así como la formación de goma debido a la oxidación y la polimerización durante el almacenamiento y la combustión. Los depósitos de carbón y el espesamiento del aceite lubricante son dos de los problemas más evidentes. Como resultado de estos problemas, se han realizado esfuerzos para convertir estos aceites vegetales en combustible biodiesel adecuado y viable (Aransiola et al., 2013).

Actualmente el biodiesel ha ganado importancia por su capacidad de reemplazar a los combustibles fósiles los cuales se están agotando rápidamente. El biodiesel es una mezcla de mono-alquil-éster obtenido a partir de aceites vegetales como aceite de soja, jatrofa, colza, palma, girasol, maíz, maní, canola y semillas de algodón. Puede también ser producido a partir de fuentes como grasas animales, aceite de cocina usado, algas y levaduras acumuladoras de lípidos (Ranganathan et al., 2008; Duarte et al., 2013). La vía más común para producir biodiesel es por transesterificación lo cual se refiere a una reacción química catalizada involucrando aceite vegetal o grasa animal y un alcohol para producir ácidos grasos, alquil éster y glicerol. En la producción de biodiesel, el glicerol es el principal biproducto, contando un 10% (p/p) aproximadamente.

El biodiesel es biodegradable y no tóxico, tiene bajos perfiles de emisión y es medioambientalmente amigable. Recientemente debido al incremento en el precio del petróleo crudo, fuentes limitadas de combustibles fósiles y preocupaciones medio ambientales, ha creado un enfoque renovado sobre aceites vegetales y grasas animales para hacer combustible biodiesel. Las grasas y los aceites son principalmente insolubles en agua, sustancias hidrofóbicas en plantas y el reino animal, que se componen de un mol de glicerol y tres moles de ácidos grasos y son comúnmente referidos como triglicéridos. Los ácidos grasos varían en la longitud de las cadenas carbonadas y en el número de enlaces no saturados (doble enlace). En grasas de vacuno el componente de ácidos grasos saturados representa casi el 50% de los ácidos grasos totales. Los aceites vegetales y las grasas animales son extraídos o prensados para obtener aceite puro o grasa. Esto usualmente contiene ácidos grasos libres, fosfolípidos, esteroides, agua, colorantes y otras impurezas.

Debido a esto se han desarrollado tres metodologías para la producción de biodiesel a partir de aceites, denominadas microemulsión, pirolisis y transesterificación. La transesterificación es el método más popular y preferido. La pirolisis se refiere a cambios químicos causados por aplicación de calor para obtener compuestos más simples. Este proceso también se conoce como rompimiento térmico (Cracking). El material pirolizado puede ser aceite vegetal, grasa animal, ácidos grasos naturales y metil éster de ácidos grasos. Los aceites vegetales pueden romperse para reducir la viscosidad, el producto incluye alcanos, alquenos y ácidos carboxílicos. Mediante esta técnica se lograron buenas características de flujo debido a la reducción de la viscosidad. La desventaja de utilizar esta técnica es que el proceso incluye equipos de alto costo y es necesaria la separación de varias fracciones, además el producto obtenido fue similar a la gasolina conteniendo sulfuro lo cual hace de este un proceso menos eco-amigable (Ma y Hanna, 1999). Las microemulsiones son mezclas claras, isotrópicas y termodinámicamente estables de una fase polar con una fase no polar obtenido de forma espontánea con la ayuda de un agente tensoactivo y a veces un co-tensoactivo (Dantas et al., 2013).

La transesterificación es la reacción de una grasa o aceite con un alcohol para formar éster y glicerol. La reacción puede ser facilitada por catálisis usando alcoholes alifáticos monohídricos primarios o secundarios, que tienen de 1 a 8 átomos de carbono. Para el equilibrio de esta reacción se requieren grandes cantidades de alcohol. El metanol y el etanol son los alcoholes más usados, el etanol es el alcohol preferido ya que se puede derivar de productos agrícolas, es biodegradable y biológicamente menos objetable a nivel ambiental. Sin embargo, el metanol es el más utilizado debido a su bajo costo y sus ventajas físico-químicas (Aransiola et al., 2013). El proceso de transesterificación puede hacerse a través de un gran número de vías, por ejemplo, usando una catálisis alcalina, catálisis ácida, biocatálisis, catálisis heterogénea o usando alcoholes, la reacción general es como se muestra en la figura 2.4.

2.4.2. Glicerol de Biodiesel

El principal biproducto en la producción de biodiesel es el glicerol crudo, el cuál es cerca del 10% de peso del material de desecho inicial. Especialmente, el glicerol crudo es una mezcla de glicerol, alcohol, sales, metales pesados, ácidos grasos libres,

metil éster, monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos en cantidades variables dependiendo de la calidad del material de desecho y del proceso químico utilizado para obtener el biodiesel. En el presente, en algunas regiones, el glicerol tiene que ser eliminado como residuo debido a que el mercado existente no puede absorber el incremento de la producción del biproducto, el glicerol crudo tiene pocos usos directos debido a las impurezas que contiene, el tratamiento y el refinamiento es costoso para las pequeñas y medianas industrias (Varrone et al., 2013).

Dentro de este escenario, muchos investigadores se esfuerzan por desarrollar estrategias económicas para el uso del glicerol crudo con la finalidad de hacer sostenible el costo de la producción de biodiesel a largo plazo y utilizar el gran excedente de glicerol liberado. Entre ellos, la valorización de este residuo como un cosustrato en plantas de digestión anaerobia es una solución promisoriosa, debido a que una fuente de energía renovable es obtenida a partir del tratamiento. Varios estudios han sido publicados con referencia a los beneficios de la adición de glicerol utilizando experimentos en continuo y/o batch, para incrementar la digestión anaerobia de materiales como agrodesechos, heces del ganado bovino y porcino, desechos de frutas y vegetales, fracciones orgánicas de aguas de desecho municipales, lodos de depuradoras, mezcla de molino de aceite y aguas residuales del matadero, los desechos industriales de la mezcla de estiércol y productos orgánicos, en la actualidad una gran parte del glicerol crudo es quemado para obtener energía (da Silva et al., 2009).

El glicerol de desecho constituye una fuente de carbono versátil con múltiples aplicaciones en las fermentaciones industriales. Debido a su bajo costo y su amplia disponibilidad, se ha intentado valorizar el glicerol crudo mediante procesos de fermentación microbiana, la más común valorización de glicerol se refiere a su conversión en 1,3-propanediol. Además, el glicerol crudo se ha empleado como un sustrato para la producción de otros metabolitos microbiales, tales como ácidos orgánicos, polioles, lípidos y masa microbial en fermentaciones realizadas por especies de levaduras, hongos o algas en operaciones en Batch, continuo y semicontinuo (Chatzifragkou et al., 2011).

En resumen, en los últimos años, se han presentado decenas de oportunidades de utilización de glicerol crudo y se han logrado prometedores resultados. Sin embargo, es imperativo señalar que todavía hay obstáculos técnicos en el desarrollo de procesos prácticos para utilizar directamente el glicerol crudo resultado de la

producción de biodiesel a gran escala. Una visión rápida de lo que ha sido investigado, con respecto a potenciales químicos de conversiones catalíticas biológicas y convencionales de glicerol crudo se resumen en el artículo de Chatzifragkou et al., (2011).

2.5. Bibliografía

- Andersen, D. C., y Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2), 117–23.
- Aransiola, E. F., Ojumu, T. V., Oyekola, O. O., Madzimbamuto, T. F., y Ikhu-Omoregbe, D. I. O. (2013). A review of current technology for biodiesel production: State of the art. *Biomass and Bioenergy*, 1–22.
- Arnau, C., Ramon, R., Casas, C., y Valero, F. (2010). Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(6), 494–500.
- Arnau, C., Casas, C., y Valero, F. (2011). The effect of glycerol mixed substrate on the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system. *Biochemical Engineering Journal*, 57, 30–7.
- Assenberg, R., Wan, P. T., Geisse, S., y Mayr, L. M. (2013). Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(3), 393–402.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *E.coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 411–21.
- Barrigón, J. M., Montesinos, J. L., y Valero, F. (2013). Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut⁺ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures? *Biochemical Engineering Journal*, 75, 47–54.
- Beer, H. D., McCarthy, J. E., Bornscheuer, U. T., y Schmid, R. D. (1998). Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1399(2-3), 173–80.
- Brondyk, W. H. (2009). Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods in enzymology* (1st ed., Vol. 463).
- Celik, E., y Calik, P. (2011). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1108–1118.
- Cereghino, J. L., y Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66.
- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., y Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36(2), 1097–1108.
- Chen, R. (2011). Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1102–07.
- Choi, J. H., Keum, K. C., y Lee, S. Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 876–85.
- Corchero, J. L., Gasser, B., Resina, D., Smith, W., Parrilli, E., Vázquez, F., y Villaverde, A. (2013). Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics. *Biotechnology Advances*, 31(2), 140–53.

- Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J. L., Ferrer, P., Cregg, J. M., y Valero, F. (2005). combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 116, 321–35.
- Cos, O., Ramon, R., Montesinos, L., y Valero, F. (2006). A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(1), 145–54.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., y Raschke, W. C. (1993). Recent Advances in the expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Bio/technology Nature Publishing Group, Vol 11*, 905–10.
- Da Silva, G. P., Mack, M., y Contiero, J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), 30–9.
- Damasceno, L. M., Huang, C. J., y Batt, C. a. (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 31–9.
- Dantas Neto, A., Fernandes, M. R., Barros Neto, E. L., Castro Dantas, T. N., y Moura, M. C. P. (2013). Effect of Biodiesel/Diesel-based microemulsions on the exhaust emissions of a diesel engine. *Brazilian Journal of Petroleum and Gas*, 7(4), 141–53, 2.
- Duarte, S. H., de Andrade, C. C. P., Ghiselli, G., y Maugeri, F. (2013). Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. *Bioresource Technology*, 138, 377–81.
- Ferreira-Dias, S., Sandoval, G., Plou, F., y Valero, F. (2013). The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3).
- Gao, M., y Shi, Z. (2013). Process control and optimization for heterologous protein production by methylotrophic *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 21(2), 216–26.
- García, D. J. (2010). Plantas como fábricas de proteínas recombinantes humanas. *Cultura Del Cuidado Enfermería*, 7(2), 39–50.
- Gellissen, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6), 741–50.
- Gould, S. J., McCollum, D., Spong, A. P., Heyman, J. A., y Subramani, S. (1992). Development of the yeast *Pichia pastoris* as a model organism for a genetic and molecular analysis of peroxisome assembly. *Yeast*, 8(8), 613–28.
- Hasan, F., Shah, A, y Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235–51.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., y Comeau, L. C. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(5-6), 421–30.
- Invitrogen. (2012). *Pichia* Expression Kit: For expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*.
- Jaeger, K.-E., y Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 390–7.

- Jarvis, D. L. (2009). Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods in enzymology* (1st ed., Vol. 463).
- Koutz, P., Davis, G. R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J., y Thill, G. (1989). Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast (Chichester, England)*, 5(3), 167–77.
- Lara, A. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10, 209–223.
- Ma, F., y Hanna, M. A. (1999). Biodiesel production : a review. *Bioresource Technology*, 70, 1–15.
- Minning, S., Schmidt-Dannert, C., y Schmid, R. D. (1998). Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *Journal of Biotechnology*, 66(2-3), 147–56.
- Muthu, H., Selvabala, V. S., Varathachary, T. K., Selvaraj, D. K., Nandagopal, J., y Subramanian, S. (2010). Synthesis of biodiesel from neem oil using sulfated zirconia via tranesterification. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(4), 601–608.
- Papaneophytou, C. P., y Kontopidis, G. (2014). Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein Expression and Purification*, 94, 22–32.
- Porro, D., Gasser, B., Fossati, T., Maurer, M., Branduardi, P., Sauer, M., y Mattanovich, D. (2011). Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: when are these systems better than bacterial production systems?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 939–48.
- Potvin, G., Ahmad, A., y Zhang, Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 91–105.
- Ramón, R., Ferrer, P., y Valero, F. (2007). Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 130(1), 39–46.
- Ranganathan, S. V., Narasimhan, S. L., y Muthukumar, K. (2008). An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, 99(10), 3975–81.
- Ren, H. T., Yuan, J. Q., y Bellgardt, K. H. (2003). Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. *Journal of Biotechnology*, 106(1), 53–68.
- Schmidt-Dannert, C. (1999). Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 7(10), 2123–30.
- Sharma, R., Chisti, Y., y Banerje, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627–662.
- Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H., y Czermak, P. (2015). Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 1–17.
- Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J. T., Smith, P. L., y Birkenberger, L. A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 190(1), 55–62.

- Takahashi, S., Ueda, M., Atomi, H., Beer, H. D., Bornscheuer, U. T., Schmid, R. D., y Tanaka, A. (1998). Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(2), 164–8.
- Tecelão, C., Guillén, M., Valero, F., y Ferreira-Dias, S. (2012). Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase: A feasible biocatalyst for the production of human milk fat substitutes. *Biochemical Engineering Journal*, 67, 104–10.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 211–22.
- Varrone, C., Liberatore, R., Crescenzi, T., Izzo, G., y Wang, A. (2013). The valorization of glycerol: Economic assessment of an innovative process for the bioconversion of crude glycerol into ethanol and hydrogen. *Applied Energy*, 105, 349–57.
- Walsh, G. (2006). Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nature Biotechnology*, 24(7), 769–76.
- Yang, F., Zhang, S., Lin, X., Jin, G., y Zhao, Z. K. (2011). Purification and characterization of a β -1,3-glucomannanase expressed in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(2), 223–28.
- Yin, J., Li, G., Ren, X., y Herrler, G. (2007). Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 335–47.
- Yurimoto, H., Oku, M., y Sakai, Y. (2011). Yeast methylotrophy: Metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis. *International Journal of Microbiology*, 2011.
- Zalai, D., Dietzsch, C., Herwig, C., y Spadiut, O. (2012). A dynamic fed batch strategy for a *Pichia pastoris* mixed feed system to increase process understanding. *Biotechnology Progress*, 28(3), 878–86.
- Zhang, W., Inan, M., Meagher, M. M., y Inan, M. (2000). Fermentation Strategies for Recombinant Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering*, 5, 275–87.
- Zhu, J. (2011). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1158–1170.

Capítulo 3

MATERIALES Y METODOS

Contenido

3. MATERIALES Y METODOS	39
3.1 Cepas, Soluciones y medios de cultivo.	41
3.1.1. Cepas	41
3.1.2. Soluciones	41
3.1.3. Medios de Cultivo	42
3.2. Fermentador	44
3.3. Protocolo de fermentación.....	45
3.3.1. Inóculo.....	45
3.3.2. Cultivo en Discotínuo (Batch).....	45
3.3.3. Cultivo en Semicotínuo (Fed-Batch)	46
3.3.4. Sistema de Adición de sustratos y cosustratos	47
3.4. Métodos Analíticos.....	48
3.4.1. Determinación de la Concentración de Biomasa	48
3.4.2. Determinación de la Actividad Lipolítica Extracelular	48
3.4.3. Análisis Cuantitativo de Proteínas	50
3.4.4. Determinación de la Actividad Proteolítica.....	51
3.4.5. Determinación de la Actividad Alcohol Oxidasa Intracelular.....	52
3.4.6. Determinación de la Concentración de Glicerol, Sorbitol y Metanol	52
3.4.7. Monitorización en Línea de la Concentración de Metanol	53
3.5. Cálculos.....	53
3.5.1. Cálculo de las Velocidades Específicas.....	53
3.5.2. Cálculo de los Rendimientos	55
3.5.3. Cálculo de las Productividades	56
3.6. Bibliografía	58

3. MATERIALES Y METODOS

En este capítulo se describen los materiales y métodos utilizados en el trabajo. En caso de utilizar materiales y/o métodos específicos, serán detallados en el presente capítulo correspondiente.

3.1 Cepas, Soluciones y medios de cultivo.

3.1.1. Cepas

El trabajo se llevó a cabo utilizando la cepa silvestre Mut⁺ de *Pichia pastori* que contiene el vector pPICZ α A-ROL para la expresión heteróloga de la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) bajo el control del promotor P_{Aox1} (Minning et al., 2001).

3.1.2. Soluciones

Antiespumante: Disolver 15 mg de antiespumante (Antifoam 204, Sigma A6426) en un litro de agua destilada. La concentración óptima de antiespumante en el medio de cultivo es de 15 mg/L. No se deben adicionar grandes cantidades de antiespumante, ya que altera el equilibrio del oxígeno disuelto entre la fase líquida y gaseosa, dificultando su transferencia.

500X Biotina (0.02%): Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua destilada, filtrar en condiciones estériles y guardar a 4°C.

Solución de Sales Traza: Para la preparación de un litro se emplean las cantidades que se describen en la tabla 3.1.

Solución de Metanol: La solución de metanol para adicionar durante la fase de transición e inducción en los cultivos semicontinuos estará compuesta de metanol puro, 5 mL/L de solución de sales traza y 2mL/L de solución de biotina 500X.

Tabla 3.1 Solución de sales traza			
Reactivo	Peso (g)	Proveedor	Ref.
Sulfato de Cobre pentahidratado (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	6.0	Sigma	209198
Yoduro de Sodio (NaI)	0.08	Panreac	141726
Sulfato de Manganeso monohidratado (MnSO ₄ ·H ₂ O)	3.0	Panreac	131413
Molibdato de Sodio dihidratado (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0.2	Panreac	141701
Acido Bórico (H ₃ BO ₃)	0.02	Panreac	131015
Cloruro de Cobalto (CoCl ₂)	0.5	Merck	2539
Cloruro de Zinc (ZnCl ₂)	20.0	Panreac	141779
Sulfato de Hierro heptahidratado (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	65.0	Panreac	141362
Biotina	0.2	Sigma	B4501
Acido Sulfúrico (96%)	5.0 mL/L	Panreac	211058
filtrar en condiciones estériles y guardar a 4°C			

Solución de Glicerol: La solución de glicerol para adicionar durante la fase de inducción fué de 550 g/L de glicerol + 204 g/L de NH₄Cl + 2 mL/L de Biotina + 5 mL/L de sales traza.

Solución de Sorbitol: La solución de sorbitol para adicionar durante la fase de transición e inducción en los cultivos semicontinuos fué de 300 g/L de sorbitol + 108 g/L de NH₄Cl + 2 mL/L de Biotina + 5mL/L de sales traza.

3.1.3. Medios de Cultivo

Medio de cultivo YPD (Yeast extract peptone dextrose medium) para *P. pastoris*: Medio utilizado para la preparación del inóculo. En la tabla 3.2 se indican las cantidades para preparar 1 L de solución.

Tabla 3.2 Medio de cultivo YPD (Yeast extract peptone dextrose médium)			
Reactivo	Concentración (g)	Proveedor	Referencia
Dextrosa	20	Quimivita	GL0043QP
Peptona	20	OXOID	LP0037
Extracto de levadura	10	OXOID	LP0021
Antes de inocular, si la cepa lo requiere, adicionar 100 µg/mL de zeocina			

Medio para cultivo en erlenmeyers para *P. pastoris*: Este medio es utilizado para el crecimiento de las cepas en erlenmeyers, en la tabla 3.3 se indica la cantidad de reactivo por litro de solución. La fuente de carbono es la requerida de acuerdo al experimento: BMG (Buffered Minimal Glicerol) y BMM (Buffered Minimal Methanol)

Tabla 3.3 Medio para cultivo en frascos agitados para *P. pastoris*

Reactivos	Concentración
Fosfato de Potasio pH6.0	100 mM
YNB (Yeast Nitrogen Base)	1.34 %
Biotina	4×10^{-5} %
Fuente de Carbono	1%

Medio de cultivo BMC (Batch Complex Medium) para *P. pastoris*: Medio utilizado para fermentaciones en discontinuo. En la tabla 3.4 se indica la cantidad de reactivo en peso por litro de solución.

Tabla 3.4 Medio de cultivo BMC para *P. pastoris*

Reactivos	Peso (g)	proveedor	Referencia
Sulfato de amonio	25 g		
YNB (Yeast Nitrogen Base)	1.7 g	Difco	223054
Antiespumante 204	5 gotas	Sigma	A6426
Fuente de Carbono	1%		

La fuente de carbono (Glicerol y/o Metanol) se adiciona dependiendo del experimento a realizar. El YNB se adiciona después de esterilizar el medio.

El pH se mantiene a 5.5 con una adición controlada de una solución estéril de KOH 1M. Antes de inocular se introducen 5 mL/L de sales traza (Tabla 3.1) y 2 mL/L de la solución de biotina 500X

Medio Invitrogen: (Tomado de “A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*” (Invitrogen, 2012)). Medio utilizado para fermentaciones en semicontinuo. Cantidades para preparar 1 L de solución.

Reactivo	Concentración (g)	Proveedor	Referencia
Ácido ortofosfórico (85%)	26.7 mL/L	Panreac	141032
Sulfato de calcio	0.93	Panreac	121253
Sulfato de potasio	18.2	Panreac	141532
Sulfato de magnesio heptahidratado	14.9	Panreac	131404
Hidróxido de potasio	4.13	Panreac	141515
Glicerol	40	Panreac	141339
Antiespumante 204	5 gotas	Sigma	A6426
Biotina y sales traza se adicionan después de esterilizar y antes de calibrar la sonda de pO ₂ .			

Antes de inocular se introducen 5 mL/L de sales traza (Tabla 3.1) y 2 mL/L de la solución de biotina 500X. El pH se mantiene a 5.5 con una adición controlada de una solución de amoníaco al 30% durante la fase discontinua de crecimiento con glicerol y luego se cambia a KOH 1M para la fase de transición e inducción.

3.2. Fermentador

Para llevar a cabo las fermentaciones se utilizó el fermentador Applikon (Figura 3.1), Este equipo incluye una cuba de 7 Litros, una unidad de control DCU conectada a un ordenador donde se encuentra operativo el software LabView que permite controlar los parámetros de la fermentación, una sonda que monitoriza el pH al cual se desea trabajar, una sonda de pO₂ para controlar el oxígeno disuelto, sonda de temperatura, bombas peristálticas para controlar el ingreso de ácidos/bases y de antiespumante, y un sistema de agitación. También se puede controlar externamente el equipo de adición de los caudales de alimentación utilizando microburetas.



Figura 3.1: Vista del fermentador Applikon utilizado.

3.3. Protocolo de fermentación.

3.3.1. Inóculo

Las cepas utilizadas en este trabajo experimental son conservadas en tubos eppendorff de 2 mL a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un medio rico en glicerol (Invitrogen, 2012). A continuación, se realizó un cultivo en Erlenmeyer de 1 Litro con 250 mL de medio YPD (tabla 3.2) se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 140 rpm, luego de 24 horas la absorbancia que deben alcanzar los erlenmeyers ha de estar sobre 0.7 - 0.8 para conseguir que todo el proceso de fermentación sea reproducible. Se centrifugó a 8000 rpm durante 20 min, resuspendiendo las células en 200 mL de agua destilada estéril para su inoculación en el reactor.

3.3.2. Cultivo en Discotínuo (*Batch*)

Para este cultivo se utilizó un volumen de fermentación de 3.0 L. Este sistema de cultivo se llevó a cabo utilizando el medio BMC (Tabla 3.4) a diferentes concentraciones de la fuente de carbono. Los cultivos se realizaron a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una consigna de aireación de 2.0 L/min y una agitación de 800 rpm.

El reactor se esterilizó por calor mediante autoclave conteniendo del medio de cultivo la fuente de carbono, el antiespumante y el sulfato de amonio, agregando posteriormente el resto de los componentes del medio BMC esterilizados mediante

filtración con filtro Millipore 0.22 μm de diámetro de poro (Sterivex-Gp 0.22 μm polietersulfona). El inóculo se obtuvo como se ha descrito en el apartado 3.3.1.

Con las bombas peristálticas se alimenta la solución de amonio al 30% (utilizado como base para controlar el pH a 5.5) y para la inoculación, luego se agrega agua para enrasar a 3.0 L y finalmente para la adición puntual de antiespumante.

3.3.3. Cultivo en Semicontinuo (*Fed-Batch*)

Los cultivos en semicontinuo presentan tres fases:

La primera fase es la obtención de biomasa, a partir de una concentración inicial de aproximadamente 1 g/L de biomasa. Las condiciones de trabajo para este cultivo son de temperatura a 30 °C y agitación fijada entre 800-1000 rpm. El pH se mide mediante una sonda introducida al interior del reactor y se mantiene a un valor de 5.5 mediante la adición de amoniaco al 30% durante esta fase, el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio se mide mediante una sonda de pO_2 , se mantiene un caudal de aire de 2 L/min. Al término de esta fase se observa una súbita subida de oxígeno disuelto, lo que indica que el microorganismo ha consumido en su totalidad la fuente de carbono y por ende ha detenido su metabolismo de crecimiento. En la fermentación de *P. pastoris* esta fase presenta una duración aproximada de 20 horas.

La segunda fase es la fase de transición, en esta se procede al cambio gradual de la fuente de carbono utilizada por el microorganismo. Desde la adicionada inicialmente para la obtención de biomasa, a la de inducción en nuestro caso metanol para así activar el promotor P_{AOX1} y con ello la producción de la proteína recombinante. Esta fase presenta una duración de 5 horas y utiliza los siguientes caudales de glicerol y metanol. Durante las dos primeras horas sólo se alimenta glicerol con un caudal constante de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ para irse reduciendo en las tres siguientes horas a 160, 100 y finalmente 65 $\mu\text{L}/\text{min}$ en la última hora. Simultáneamente a partir de la tercera hora se adiciona un caudal constante de metanol de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La tercera fase es la fase de inducción (producción), en esta fase el cultivo es alimentado con metanol como sustrato inductor y/o con un cosustrato.

3.3.4. Sistema de Adición de sustratos y cosustratos

Para llevar a cabo la etapa de inducción de la proteína heteróloga, se dispone de microburetas automáticas modelo microBUR-2031 de *Crison instruments*, una para alimentación con metanol y otra para la alimentación del cosustrato y se controlan mediante un programa de ordenador diseñado por O. Cos (UAB), que dispensa de forma periódica las cantidades establecidas para la estrategia de control.

Inicialmente se realiza una esterilización química de las jeringas y los tubos a utilizar. Para la esterilización se realizan ciclos de 10 inyecciones con el volumen total de las microburetas a utilizar con las siguientes soluciones o líquidos en el siguiente orden: agua estéril, ácido clorhídrico (1M), agua estéril, Hidróxido de sodio (1M), agua estéril, etanol (70%) y agua estéril.

Adición con un *set-point* de metanol: Para realizar el seguimiento de la concentración de metanol en el medio se utiliza un analizador de metanol (Unidad de detección y sensor de metanol marca Raven Biotech Inc.), y para su control en línea un sistema de control predictivo acoplado a un PI desarrollado originalmente por Cos et al., (2006) y adaptado posteriormente por Barrigón et al., (2013). Este sistema de control incluye el cálculo del consumo de metanol durante todo el cultivo y permite superar desviaciones no deseadas, o bien cambios en la consigna de la concentración de metanol durante el bioproceso.

El calibrado utilizado para llevar a cabo la medida de la concentración de metanol sigue la siguiente ecuación exponencial:

$$[MetOH] = y_0 + a \cdot e^{b \cdot V} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde [MetOH] es la concentración de metanol en g/L, V es el voltaje medido por el sensor, a y b son las constantes de la curva exponencial de calibrado (anexo 1).

Adición exponencial de glicerol/sorbitol: Para la adición de glicerol se utiliza una estrategia de adición exponencial preprogramada con el objetivo de controlar, en lazo abierto, la velocidad específica de crecimiento del microorganismo durante la fase de inducción. A partir del balance de sustrato en la fase semicontinua, se puede obtener la relación entre la velocidad específica de crecimiento, el caudal de adición de sustrato y la concentración de biomasa.

$$Q_o = \frac{X(g/L) \cdot V(L) \cdot \mu_{sp} (h^{-1})}{Y_{x/s} \cdot S_o} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde Q_o es el caudal inicial de adición del sustrato en L/h, V es el volumen inicial en la fase de inducción en litros, X es la biomasa inicial en g/L, μ_{sp} es la velocidad específica de crecimiento de consigna, S_o es la concentración de sustrato en el alimento y $Y_{x/s}$ es el rendimiento biomasa-sustrato que se considera constante y conocido a lo largo de la fase de inducción. Luego la velocidad de flujo de la alimentación es actualizada de acuerdo a la ecuación 3.3.

$$Q_t = Q_o \cdot e^{\mu_{sp}(t-t_o)} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

3.4. Métodos Analíticos.

3.4.1. Determinación de la Concentración de Biomasa

La medida de la concentración de biomasa se obtiene mediante densidad óptica para *P. pastoris* a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro, en el rango de absorbancia entre 0.1 y 0.8, si es mayor se diluye la muestra, el aumento de la densidad óptica refleja un aumento de la biomasa. El valor resultante se correlaciona con una curva de calibración (Anexo 2).

3.4.2. Determinación de la Actividad Lipolítica Extracelular

Este análisis está basado en una modificación del test *Lipase colorimetric assay* (Roche Diagnostics) desarrollado para la detección de la lipasa humana. El test se basa en el ataque de la enzima LIP a un sustrato cromóforo específico de lipasa el cual, a través de una serie de reacciones encadenadas dan lugar a un producto

coloreado (Figura 3.2). El pH y la temperatura fijadas por el test han sido modificadas dada la diferente naturaleza de la lipasas, utilizando en este ensayo la lipasa de ROL que presenta la máxima actividad a pH de 7.4 y una temperatura de 30°C (Minning et al., 1998).

El método utilizado se fundamenta en la degradación de un sustrato cromóforo específico para la lipasa, el 1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-ácido glutárico-(6-metilresofurina)-éster, el cual en solución alcalina bajo la acción catalítica de la lipasa es degradado formando el 1,2-o-dilauril-rac-glicerol y el ácido glutárico-(6-metilresofurina)-éster, un producto intermedio inestable (Figura 3.2). Este compuesto inestable se descompone espontáneamente en ácido glutárico y metilresofurina. La metilresofurina es un colorante rojo cuya intensidad cromática es directamente proporcional a la actividad lipolítica y se mide fotométricamente a una longitud de onda de 580 nm.

El análisis se realizó mezclando 0.5 mL de la muestra a analizar, previamente centrifugada para separar la biomasa, con 0.5 mL de tampón Tris-HCl 400 mM, pH 7.25, el cual contiene CaCl₂ 10 mM, y con 0.3 mL del reactivo colorimétrico del test de análisis Roche. La reacción se sigue a 580 nm, durante 8 min y a una temperatura de 37 °C en un espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary3, conectado a un ordenador en donde se obtiene en línea la gráfica de la absorbancia. La pendiente de recta

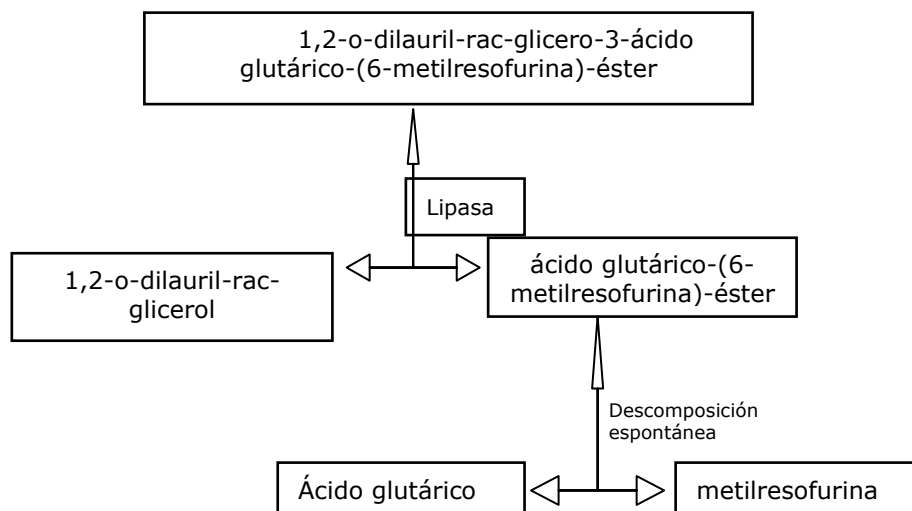


Figura 3.2. Esquema de reacción colorimétrica para la detección de actividad de la lipasa.

(Abs/min), medida que se realiza en el intervalo de 4 a 7 minutos de reacción, con un rango de confianza del 95% entre 0.01 y 0.06, esta medida es proporcional a la actividad lipásica, si está por encima de valor indicado se diluyen las muestras con agua destilada. A partir del dato de la pendiente, se cuantifica la actividad lipásica de la muestra mediante la recta de calibración (Anexo 3) que se ajusta a la siguiente ecuación:

$$AL (U/mL) = a + b \cdot m \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Dónde AL es actividad lipolítica en U/mL, a y b son las constantes de la recta exponencial de calibrado y m es el valor obtenido en el análisis. Una unidad de actividad lipolítica (IUPAC) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol (μmol) de ácido graso por minuto de reacción; con lo que la actividad específica de la lipasa se expresa como μmol de ácido graso liberado por minuto y por miligramo de lipasa.

3.4.3. Análisis Cuantitativo de Proteínas

Análisis de proteína extracelular e intracelular: La cuantificación de proteína total se realizó en las muestras de cultivo previamente centrifugado y analizado el sobrenadante para proteína extracelular o en lisados celulares clarificados mediante centrifugación para análisis de proteína intracelular. Los lisados se realizaron utilizando un disruptor celular (Constant Cell Disruption Systems, modelo One Shot), este equipo trabaja entre 1 y 2.7 Kbars, para aumentar el número de células disruptadas en la muestra se puede realizar más de un ciclo de disruptión por muestra. Para la disruptión se utilizan 1.5 mL de muestra resuspendido en PBS, luego de la disruptión la muestra es centrifugada durante 15 minutos a 4200-g y 4°C para eliminar las células que no han sido disruptadas analizándose la proteína total y la actividad específica de la lipasa.

Método de Lowry: El análisis de proteína total se realizó mediante el método descrito por Lowry y colaboradores (Lowry et al., 1951) Este método presenta una gran utilidad, por su rapidez y reproducibilidad. Además, al presentar una baja interferencia permite ser recomendado para medios con una elevada concentración salina. Las muestras analizadas se cuantificaron utilizando la ecuación 3.5.

$$Pt \text{ (mg/mL)} = a + b \cdot m \quad \text{Ecuación 3.5}$$

Dónde Pt es proteína total en mg/mL, a y b son las constantes de la recta de calibrado (Anexo 4) y m es la medida obtenida en el análisis.

3.4.4. Determinación de la Actividad Proteolítica

El análisis de proteasas se llevó a cabo utilizando el kit QuantiCleave™ Protease Assay Kit (Sigma). Se basa en la cuantificación rápida y reproducible de proteasa. El ensayo homogéneo es realizado en una microplaca y no requiere de pasos de separación o uso de ácidos fuertes. La tripsina se provee como un estándar general de proteasa y puede ser usado para calibración secundaria de otros estándares de proteasas.

El método utiliza caseína succinilada y ácido trinitrobenzelsulfónico (TNBSA). La caseína succinilada es una caseína nativa que ha sido tratada con anhídrido succínico para bloquear las aminas primarias sobre la superficie de las proteínas. En la presencia de proteasas, la caseína succinilada es fragmentada a enlaces peptídicos, así la exposición de las aminas primarias (predominantemente α -aminas). El TNBSA reacciona con estas aminas primarias expuestas para producir un producto amarillo-naranja cuya intensidad puede ser medida a 450 nm. El incremento relativo en el color para las muestras sin caseína succinilada es una medida de la actividad de proteasa en la muestra. A partir del dato de la pendiente. Las muestras analizadas se cuantificaron utilizando la ecuación 3.6.

$$\text{Proteasas (mg/mL)} = a + b \cdot m \quad \text{Ecuación 3.6}$$

Dónde a y b son las constantes de la recta de calibrado y m es la medida obtenida en el análisis.

3.4.5. Determinación de la Actividad Alcohol Oxidasa Intracelular

El ensayo se realiza midiendo la producción de H₂O₂ durante la oxidación de metanol. Centrifugar 1 mL de medio de cultivo con *Pichia pastoris* 10.000xg por 5min a 4°C. Lavar el precipitado 2 veces con buffer fosfato 50mM (pH 7.0). Resuspender precipitado en el mismo buffer y sonicar a una frecuencia de 50Hz por 10min a 0°C. Centrifugar a 10.000xg por 5 min y recuperar el sobrenadante (extracto libre de células). Adicionar a un tubo de reacción 100 µM de buffer fosfato (pH 7.0) + 4.3 µmol fenol + 10 U de peroxidasa + 1 µmol 4-aminoantipyrine + 200 µmol de metanol + enzima para un volumen total de 3 mL. La reacción se lleva a cabo a 37 °C por 10 min. La tasa de reacción se mide por el incremento en la absorbancia a 500nm y calculando a partir de la curva de calibración. Una unidad de enzima es definida como la formación de un µmol de H₂O₂ por minuto (Zhang et al., 2009).

$$AOX (U/mL) = (a + b \cdot m) \cdot d \quad \text{Ecuación 3.7}$$

Dónde a y b son las constantes de la recta exponencial de calibrado y m es el valor obtenido en el análisis a y b es la medida obtenida de la muestra y d es el factor de dilución de la muestra.

3.4.6. Determinación de la Concentración de Glicerol, Sorbitol y Metanol

Este método permite el análisis de azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos, usados como fuente de carbono para el cultivo de microorganismos, así como la mayoría de los productos de su metabolismo, ácidos orgánicos y alcoholes.

Los metabolitos se determinan por HPLC con el equipo HP 1050 (liquid chromatograph, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) utilizando una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H (Bio-rad). Como fase móvil se utiliza una solución de ácido sulfúrico 15 mM con un volumen de inyección de 20 µL. Los datos son monitorizados y cuantificados utilizando el software Millenium 2.15.10 (Waters Corporation, Mildford, MA, USA).

Preparación de las muestras: Las muestras a analizar deben estar previamente centrifugadas y filtradas por una membrana de 0.45 μm de diámetro de poro (tipo Millipore HAWP01300, Bedford, USA). Estas deben quedar totalmente transparentes y sin partículas en suspensión. Para los análisis se mezclan volúmenes iguales de la muestra y del patrón interno.

3.4.7. Monitorización en Línea de la Concentración de Metanol

Se realiza la determinación de metanol en línea, para así llevar un control exhaustivo del metanol en el interior del biorreactor. El rango de análisis de este analito está comprendido entre los 0.1 y 10 g/L. La concentración es calculada de acuerdo a la recta de calibrado descrita en el anexo 1.

3.5. Cálculos.

En este apartado se presentan las bases teóricas y las herramientas utilizadas para el cálculo de algunos parámetros que ayudan a interpretar y obtener más información de los cultivos.

3.5.1. Cálculo de las Velocidades Específicas

A partir de las principales variables de seguimiento durante la fermentación, la concentración de biomasa, de sustrato y de actividad enzimática se pueden calcular las velocidades específicas de crecimiento (μ), de consumo de sustrato (q_s), y de generación de actividad lipolítica (q_p), respectivamente.

Estas variables pueden dar información muy valiosa para analizar a posteriori la evolución de la fermentación, para relacionarlos con el estado fisiológico del microorganismo y para la detección de cambios de comportamiento.

Se suavizan los datos experimentales mediante rutinas matemáticas (Matlab 6.1 Curvefit Toolbox, The Mathworks Inc., Natick, USA). Durante el cultivo la cantidad

de biomasa aumenta de tal forma que el volumen de la fase acuosa se reduce progresivamente. Algunos datos experimentales, como la actividad lipolítica extracelular y la concentración de sustrato, se determinan únicamente a partir de los sobrenadantes. De este modo, hay que tener en cuenta el volumen ocupado por la biomasa a la hora de expresar las concentraciones determinadas en la fase líquida en función del volumen total del bioreactor (Borzani, 2003). Los valores expresados a lo largo de este trabajo corresponden a las concentraciones de sustrato y actividad lipolítica determinadas por unidad de volumen del caldo de cultivo.

Los caudales de sustrato adicionado se determinan a partir de la alimentación con las microburetas, así como también el caudal de base introducido al sistema. El volumen del fermentador se estima a partir del volumen inicial y el cómputo de las adiciones (sustrato, base, etc.) y extracciones significativas. Se descuentan los volúmenes retirados del biorreactor, que se pueden entrar manualmente para la corrección del volumen.

Las velocidades específicas se calculan a partir de los balances de materia del cultivo (Cos et al., 2005). A continuación se indican los correspondientes balances para cultivos en discontinuo y semicontinuo.

Cultivo en discontinuo

BIOMASA

$$\mu \text{ (g/mL)} = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad \text{Ecuación 3.5.8}$$

SUSTRATO

$$q_s \text{ (g/g} \cdot \text{h)} = -\frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad \text{Ecuación 3.5.9}$$

PRODUCTO

$$q_p \text{ (U/g} \cdot \text{h)} = \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad \text{Ecuación 3.5.10}$$

Cultivo en semicontinuo

El proceso en semicontinuo se caracteriza por la entrada de sustrato con la correspondiente variación de volumen ya que no hay corriente de salida.

BIOMASA: El cálculo de la μ para un cultivo en semicontinuo depende del volumen, la biomasa y la variación de éstos a lo largo del tiempo.

$$\mu_{(t)} = \frac{1}{(XV)_t} \frac{d(XV)_t}{dt} \quad \text{Ecuación 3.11}$$

SUSTRATO: Para el cálculo de q_s se debe conocer el valor de la concentración de biomasa, el caudal adicionado, el volumen, la concentración de sustrato alimentado al biorreactor y la variación de la concentración de sustrato en el biorreactor y el volumen a lo largo del tiempo.

$$q_{S(t)} = \frac{1}{(XV)_t} \left(F_t \cdot S_{feed} - \frac{d(SV)_t}{dt} \right) \quad \text{Ecuación 3.12}$$

PRODUCTO: Para determinar la q_p es necesario conocer la concentración de producto en el interior del fermentador y el volumen, junto con su evolución a lo largo del tiempo y la concentración de la biomasa.

$$q_{P(t)} = \frac{1}{(XV)_t} \frac{d(PV)_t}{dt} \quad \text{Ecuación 3.13}$$

3.5.2. Cálculo de los Rendimientos

Los rendimientos son parámetros muy importantes ya que representan la eficacia de conversión de una variable respecto a otra. Por ejemplo, el rendimiento biomasa/sustrato, nos da una idea de qué tanto cada gramo de sustrato pasa directamente a biomasa. Se pueden calcular en un intervalo determinado de la

fermentación, siendo rendimientos parciales o por el contrario para toda la fermentación, denominándose rendimientos totales.

Es importante entender que este coeficiente no se mantiene constante durante toda la fermentación, ya que cambia con rapidez según las necesidades energéticas del microorganismo. A continuación se presenta la forma de cálculo de los diferentes rendimientos, en todos los casos para cultivos en discontinuo o semicontinuo.

Rendimiento biomasa / sustrato ($Y_{x/s}$): Se define como la cantidad total de biomasa formada por sustrato total consumido.

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta(XV)}{S_{consumido}} \quad \text{Ecuación 3.14}$$

Rendimiento producto / biomasa ($Y_{p/x}$): Se define como la cantidad total de producto formado por unidad de masa total celular generada.

$$Y_{p/x} = \frac{\Delta(PV)}{\Delta(XV)} \quad \text{Ecuación 3.15}$$

3.5.3. Cálculo de las Productividades

La productividad se puede definir como la relación entre la cantidad de producto obtenido respecto o no de un parámetro clave en un período de tiempo determinado. De forma más concreta en el caso de los bioprocesos la productividad volumétrica se define como la cantidad de producto formado por unidad de volumen y tiempo. Análogamente, la productividad específica se calcula como la cantidad de producto formado por unidad de masa celular y tiempo.

Evidentemente, y de manera similar a los rendimientos, se puede calcular su valor por un período de tiempo o por todo el cultivo, aunque es este último el que quizás es más útil ya que contiene información valiosa. La metodología de cálculo es sencilla:

Productividad $= \frac{\Delta(PV)}{\Delta t}$ **Ecuación 3.16**

Productividad Volumétrica $= \frac{\Delta(PV)}{V_{final} \Delta t}$ **Ecuación 3.17**

Productividad específica $= \frac{\Delta(PV)}{\Delta(XV) \cdot \Delta t}$ **Ecuación 3.18**

Dónde:

$\Delta(PV)$: Incremento total de producto (UA).

Δt : Incremento de tiempo (h).

$\Delta(XV)$: Incremento total de biomasa (g).

3.6. Bibliografía

- Borzani, W. (2003). Calculation of fermentation parameters from the results of a batch test taking account of the volume of biomass in the fermenting medium. *Biotechnology Letters*, 26(4), 1953–6.
- Cos, O., Resina, D., Ferrer, P., Montesinos, J. L., y Valero, F. (2005). Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 26(2-3), 86–94
- Invitrogen. (2012). *Pichia Expression Kit: For expression of recombinant proteins in Pichia pastoris*.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193, 265–75.
- Minning, S., Schmidt-Dannert, C., y Schmid, R. D. (1998). Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *Journal of Biotechnology*, 66(2-3), 147–56.
- Minning, S., Serrano, A., Ferrer, P., Solá, C., Schmid, R. D., y Valero, F. (2001). Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 86(1), 59–70.
- Zhang, H., Loovers, H. M., Xu, L.-Q., Wang, M., Rowling, P. J. E., Itzhaki, L. S., y Perrett, S. (2009). Alcohol oxidase (AOX1) from *Pichia pastoris* is a novel inhibitor of prion propagation and a potential ATPase. *Molecular Microbiology*, 71(3), 702–16.

Capítulo 4

Producción de ROL (*Rhizopus oryzae* lipase) recombinante en la factoría celular *Pichia pastoris* mediante la utilización de glicerol crudo, obtenido como subproducto en la producción de biodiesel

Contenido

Producción de ROL (<i>Rhizopus oryzae</i> lipase) recombinante en la factoría celular <i>Pichia pastoris</i> mediante la utilización de glicerol crudo, obtenido como subproducto en la producción de biodiesel	59
4.1 Resumen	61
4.2 Introducción.....	64
4.3 Resultados y Discusión	68
4.3.1 Caracterización del Glicerol Crudo de Biodiesel.....	68
4.3.2 Cultivo en Erlenmeyers	69
4.3.3 Cultivos en Discontinuo en Biorreactor.....	72
4.3.4 Cultivo Semicontinuo en Biorreactor	78
4.4 Conclusiones.....	85
4.5 Bibliografía	86

Producción de ROL recombinante (*Rhizopus oryzae* lipase) en la factoría celular *Pichia pastoris* mediante la utilización de glicerol crudo, obtenido como subproducto de la producción de biodiesel.

4.1 Resumen

La rápida expansión de la industria del biodiesel ha creado un escenario donde es importante y desafiante tratar con la enorme cantidad de glicerol crudo generado como subproducto del proceso. Este glicerol es de difícil aceptación directa en el mercado debido a su contenido de impurezas que lo hacen no apto para su comercialización. Los productores de biodiesel a escala moderada o pequeña no pueden justificar el elevado costo de purificación del glicerol crudo, lo cual se convierte en un grave problema para su disposición final. Esto ha sido un obstáculo importante en categorizar como combustible verde al biodiesel y lo sitúa en la categoría de combustible gris (Anand y Saxena, 2012).

Con el propósito de mejorar la economía de la industria del biodiesel y de esta manera hacer frente al incremento continuo del flujo de residuos de glicerol crudo, se ha descrito la utilización de este glicerol como materia prima para la creación de biorefinerías, lo que puede representar una alternativa ambientalmente amigable. Este glicerol constituye una fuente de carbono versátil con muchas aplicaciones posibles en fermentaciones industriales para la obtención de productos de valor añadido.

Una de las aplicaciones más prometedoras del glicerol crudo es su empleo como sustrato para la producción de metabolitos microbianos tales como ácidos orgánicos, polioles, lípidos microbianos y masa microbiana en fermentaciones llevadas a cabo por levaduras, hongos o algunas especies de algas utilizando procesos de fermentación discontinua, semicontinua o continua.

El glicerol crudo utilizado en este trabajo es obtenido en dos plantas de producción de biodiesel que utilizan como materia prima aceites vegetales, naturales y reciclados. Como control se realizó un ensayo con glicerol puro comercial Panreac con un 99.6% de pureza.

Las muestras de glicerol crudo se filtraron a través de un filtro Millipore 0.22 μm de diámetro de poro (Sterivex-Gp 0.22 μm polietersulfona) diámetro para eliminar partículas en suspensión, luego se mezclaron con el resto de componentes del medio de cultivo para obtener la concentración de trabajo inicial en cada experimento llevado a cabo.

En los análisis de las muestras de glicerol crudo se observó la presencia de metanol entre 0.1-0.3 % aproximadamente. Esta concentración de metanol no es tóxica para *P. pastoris* debido a que, por su naturaleza metilotrófica, esta levadura es capaz de tolerar y usar metanol como fuente de carbono a las concentraciones observadas en el glicerol crudo (Anastácio et al., 2014).

En cultivos en erlenmeyers y en discontinuo, el rendimiento $Y_{x/s}$ obtenido se situó entre 0.48 y 0.49 g/g y la velocidad específica de crecimiento máxima entre 0.18 y 0.20 h^{-1} . No se observó un efecto negativo, en términos de rendimiento y velocidad específica de crecimiento, al utilizar glicerol crudo proveniente de la producción de biodiesel.

En el cultivo en semicontinuo, durante la fase de inducción, se alimentó al microorganismo exclusivamente con metanol, manteniendo una consigna de 2 g/L de metanol en el medio de cultivo utilizando un controlador predictivo acoplado a un controlador PI (Cos et al., 2006; Barrigón et al., 2013).

La biomasa alcanzó un valor final de 43.2 g/L, con una velocidad específica de crecimiento media de 0.024 h^{-1} , siendo inferior a lo obtenido en trabajos anteriores realizados en el grupo de investigación. Durante toda la fase de inducción se observaron fluctuaciones de la velocidad específica de crecimiento manteniéndose los valores alrededor de la media, como si se alcanzara un estado pseudo-estacionario. Las fluctuaciones observadas en la μ son causadas principalmente por problemas detectados en el control de la concentración de metanol, observándose una oscilación alrededor de la consigna de metanol entre 1 y 3.8 g/L con variaciones mayores a medida que se avanza en la fase de inducción.

El problema observado en el control de metanol se debió a errores en los ajustes de las condiciones de operación óptimas, en la puesta a punto de los parámetros del controlador al cambiarse de fermentador y problemas con la sonda de metanol. La

actividad lipolítica se incrementó durante la fase de inducción, presentando un valor máximo de 108 U/mL en 47 h de inducción. El valor obtenido del rendimiento productivo-biomasa ($Y_{P/X}$) es 1.4 veces inferior a lo reportado por Cos et al., (2005a) y parecido a los valores reportados por Barrigón et al., (2013) utilizando la misma metodología con una consigna de metanol de 2 g/L.

Los resultados muestran que el glicerol crudo derivado de biodiesel, es una fuente de carbono accesible, competente y de bajo costo para ser utilizada en el crecimiento y la producción de la proteína recombinante ROL por *P. pastoris*, lo cual permite reducir los costos de producción, aumentando la sostenibilidad medioambiental y económica de la industria del biodiesel.

4.2 Introducción

El biodiesel ha surgido como una alternativa de combustible verde. Su rápida expansión industrial ha creado un escenario donde es importante y desafiante tratar con la enorme cantidad de glicerol crudo generado como subproducto del proceso. Este glicerol es de difícil aceptación en el mercado debido a su contenido de impurezas que lo hacen no apto para su comercialización directa (Anand y Saxena, 2012).

El biodiesel, es un combustible diésel alternativo, hecho de fuentes biológicas renovables como aceites vegetales y grasas animales. Es biodegradable y no tóxico, con un bajo perfil de emisiones. Estas características permiten que sea considerado beneficioso a nivel medioambiental (Ma y Hanna, 1999). En el proceso de producción de biodiesel, la tecnología más utilizada es la transesterificación de aceites mediante catálisis química, mayoritariamente básica, obteniéndose como productos finales una fase superior que contiene el biodiesel y una fase inferior que contiene glicerol crudo combinado con otras sustancias químicas tales como trazas de glicéridos, agua, sales orgánicas e inorgánicas, una pequeña cantidad de ésteres, metanol, etanol y colorantes vegetales. El contenido exacto de la fase inferior depende del método de transesterificación y las condiciones de separación del biodiesel. (Hájek y Skopal, 2010).

En la industria, por cada 100 galones de biodiesel producidos se obtienen aproximadamente 10 galones de glicerol crudo (Chi et al., 2007; Anand y Saxena, 2012). Los productores de biodiesel a gran escala generalmente tratan y refinan el glicerol crudo a través de procesos de filtración, adiciones químicas y destilación fraccionada para obtener diferentes grados de glicerol comercial que, en función del origen de la materia prima utilizada, es directamente utilizable para su distribución en el mercado alimenticio, farmacéutico y la industria cosmética. Los productores a escala moderada o pequeña no pueden justificar el elevado costo de purificación del glicerol crudo, lo cual se convierte en un grave problema para su disposición final. (Thompson y He, 2006). Esto ha sido un obstáculo importante en categorizar como combustible verde al biodiesel y lo sitúa en la categoría de combustible gris (Anand y Saxena, 2012).

Con el objeto de mejorar la economía de la industria del biodiesel y de esta manera hacer frente al incremento continuo del flujo de residuos de glicerol crudo, se ha descrito la utilización de este glicerol como materia prima para la creación de biorefinerías, lo que puede representar una alternativa ambientalmente amigable. Este glicerol constituye una fuente de carbono versátil con muchas aplicaciones posibles en fermentaciones industriales para la obtención de productos de valor añadido. (Da Silva et al., 2009).

Una de las prometedoras aplicaciones del glicerol crudo es su empleo como sustrato para la producción de metabolitos microbianos tales como; ácidos orgánicos, polioles, lípidos microbianos y masa microbiana en fermentaciones llevadas a cabo por levaduras, hongos o algunas especies de algas utilizando procesos de fermentación discontinua, semicontinua o continua.

Durante el catabolismo aeróbico, el glicerol entra en la célula microbiana a través de la difusión facilitada o el transporte activo y es fosforilado en 3-P-glicerol, seguido por la oxidación de 3-P-dihidroxiacetona, que se convierte en 3-P-gliceraldehído. Este último entra en la vía glicolítica transformado en ácido pirúvico y luego en acetil-CoA, que es utilizado como precursor de una gran variedad de productos metabólicos. Los estudios relacionados con la valorización del glicerol crudo mediante procesos de fermentación microbiana han aumentado de forma continua, convirtiéndolo en un subproducto de valor añadido de la industria del biodiesel para su uso potencial en bioconversión (Chatzifragkou et al., 2011). Se han descrito numerosos microorganismos que pueden utilizar naturalmente el glicerol como fuente de carbono y energía. Entre ellos se encuentran: *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* y *Lactobacillus reuteri* (Cregg et al., 2009).

Sin embargo, debido al contenido de impurezas presentes en el glicerol crudo, se ha reportado la inhibición del crecimiento celular en algunos microorganismos cuando se utiliza este glicerol como materia prima en procesos fermentativos. Este es el caso de la inhibición del crecimiento observada en cepas de *Clostridium pasteurianum* debido al contenido de sales, metanol y ácidos grasos libres en el glicerol crudo. Por otro lado, un estudio realizado en el cual se utilizó el glicerol crudo para el crecimiento

microbiano y la producción de 1,3-propanediol por el microorganismo *Citrobacter freundii*, reporta que la inhibición es causada por la presencia de impurezas como ácidos grasos libres y ésteres metílicos (Anastácio et al., 2014).

Recientemente el glicerol crudo se ha utilizado como sustrato para una cepa de *Klebsiella ozytoca* y *Lactobacillus diolivorans* con el objetivo de realizar una síntesis microbiana de compuestos químicos como el 1,3-propanediol, 2,3-butanediol y etanol, logrando el desarrollo de un bioproceso, operacionalmente rentable y sostenible a nivel medio ambiental (Metsoviti et al., 2012; Pflügl et al., 2014). Además, se ha utilizado el glicerol crudo para la producción de etanol en fermentaciones discontinuas de cepas de *Pachysolen tannophilus* donde se demostró su utilidad como un sustrato potencial de bajo costo (Liu et al., 2012). En la literatura se ha descrito también la producción eficiente, económica y viable de dihidroxiacetona a partir de cultivos de *Gluconobacter frateurii* utilizando como fuente de carbono glicerol crudo derivado del biodiesel (Liu et al., 2013).

Las levaduras han sido consideradas como biocatalizadores para la producción de compuestos tales como el bioetanol, lípidos carotenoides y proteínas heterólogas. Entre todas las especies de levaduras utilizadas, *P. pastoris* es conocida por su capacidad de producir elevadas densidades celulares utilizando como sustrato glicerol y altos niveles de proteínas heterólogas con metanol como sustrato para la inducción.

En muchos casos para la utilización de glicerol crudo subproducto de la manufactura de biodiesel es necesaria la separación del metanol por su capacidad tóxica para el crecimiento de algunos microorganismos. *P. pastoris* por su naturaleza metilotrófica es un microorganismo que puede tolerar el metanol, conteniendo en su genoma la enzima alcohol oxidasa 1 (AOX1) que convierte el metanol en formaldehído. De esta manera, puede tolerar altas concentraciones de metanol y además utilizar glicerol de forma eficaz (Eda et al., 2008; Anastácio et al., 2014).

En este sentido, se ha estudiado la utilización de glicerol crudo en cepas de *P. pastoris* y se han reportado resultados favorables en la obtención de proteínas

heterólogas como eritropoyetina (Eda et al., 2008), fitasa (Tang et al., 2009) y α -amilasa (Anastácio et al., 2014).

En este contexto de revalorización del glicerol crudo obtenido como subproducto en la producción de biodiesel, el objetivo de este capítulo es valorar la utilización de glicerol crudo sin purificar, proveniente de las plantas de producción de biodiesel, BIONET y Stocks del Vallés, para su aplicación en el crecimiento celular y la producción de la proteína heteróloga ROL por la levadura *P. pastoris*.

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Caracterización del Glicerol Crudo de Biodiesel

El glicerol crudo utilizado en este trabajo es obtenido de dos plantas de producción de biodiesel que utilizan como materia prima aceites vegetales, naturales y reciclados. De la empresa Bionet Europa se utilizaron dos muestras, una de glicerol crudo con un primer proceso de filtración (Glicerol A), cuyo contenido de glicerol era de 61.2 %. La segunda muestra fue glicerol crudo (Glicerol B) obtenido directamente después de la producción de biodiesel con un contenido de 21.9 % de glicerol.

Una tercera muestra fue proporcionada por la empresa Stocks del Vallés S.A, que realiza el procesamiento de biodiesel a partir de aceites vegetales reciclados y residuos de grasas animales, el glicerol crudo (Glicerol D) de desecho del proceso tenía un contenido de glicerol de 52.3 %. Como control se realizó un ensayo con glicerol puro comercial Panreac (Glicerol C) con un 99.6 % de pureza. En la tabla 4.1 se muestran algunas características del glicerol utilizado.

Las muestras de glicerol crudo se filtraron a través de una membrana Millipore de 0.45 μm de diámetro para eliminar partículas en suspensión, luego se mezclan con el resto de componentes del medio de cultivo para obtener la concentración de trabajo inicial en cada experimento llevado a cabo. En los análisis de HPLC de las muestras de glicerol crudo se observó la presencia de metanol entre 0.1-0.3 % aproximadamente, como se indica en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Características nominales del glicerol utilizado en el ensayo

Sustrato	Glicerol (%)	Metanol (%)	Ácidos Grasos Libres (g/L)
Glicerol A	61.2 (± 1.8)	0.30 (± 0.06)	ND
Glicerol B	21.9 (± 0.7)	0.20 (± 0.04)	<1
Glicerol C	99.6 (± 0.1)	---	---
Glicerol D	52.3 (± 1.6)	0.10 (± 0.02)	<0.5

ND: No determinado

El glicerol crudo es un líquido de color marrón, siendo más oscuro el glicerol B el cual al ser combinado con el medio de cultivo presenta una coloración blanca, no apta para las lecturas de la densidad óptica en el espectrofotómetro al inicio del cultivo. Por lo tanto, fue necesario realizar un paso adicional de centrifugación de las dos primeras

muestras tomadas en este medio y resuspender las células en agua destilada para obtener el valor de la densidad óptica y estimar la biomasa para cada tiempo experimental.

4.3.2 Cultivo en Erlenmeyers

Una de las principales fases en la elaboración de bioproductos a partir de la ingeniería de bioprocesos es la obtención de biomasa celular, lo cual se logra utilizando una mezcla de elementos necesarios para el crecimiento y desarrollo de las células, donde la fuente de carbono es el principal componente para este fin, y esta fuente de carbono puede ser obtenida, generalmente, a partir de la adición de hidratos de carbono, etanol, metanol, glicerol, entre otros. En este capítulo se utiliza como fuente de carbono el glicerol crudo obtenido como subproducto en el proceso de producción de biodiesel y metanol para la inducción de la proteína heteróloga.

El objetivo es comprobar si el glicerol generado en la producción de biodiesel podría ser utilizado como fuente de carbono para el crecimiento de *P. pastoris*. Esta factoría celular es muy utilizada en la producción de proteínas recombinantes y el uso de este sustrato residual podría minimizar el coste de producción de las mismas, siempre que no se vieran afectados substancialmente los niveles de producción del producto heterólogo. Para comprobar esta hipótesis se realizaron diversos experimentos en erlenmeyer utilizando el glicerol, de los orígenes antes comentados, para determinar si esta fuente de carbono puede inhibir el crecimiento de *P. pastoris* cuando se utiliza como materia prima en fermentaciones microbianas. Los cultivos se prepararon como se describe en el apartado 3.1.3: *Medios de cultivo*, utilizando una concentración aproximada de 14 g/L de glicerol.

Respecto a la evolución del pH del medio a lo largo del cultivo se observó que varió desde 6.0 hasta 3.0 a las 48 h. Esta disminución en el pH puede explicarse debido al consumo de nutrientes y la liberación de algunos metabolitos ácidos al medio de cultivo.

Por lo que respecta al consumo del glicerol, fue muy similar para todas las muestras en los experimentos llevados a cabo en Erlenmeyer con un consumo total en un tiempo máximo de 48 h (Figura 4.1). La representación gráfica se encuentra

normalizada respecto a la concentración inicial de glicerol para poder realizar una mejor comparación entre los experimentos. Si bien el consumo fue similar, los tiempos de latencia fueron diferentes. La muestra de glicerol D presentó el tiempo de latencia más corto. Las de glicerol A y C aproximadamente unas 10 horas siendo mucho mayor la del glicerol de origen B. Parece claro que el glicerol B, sin ningún tipo de purificación, requiere de un mayor tiempo de adaptación de la cepa.

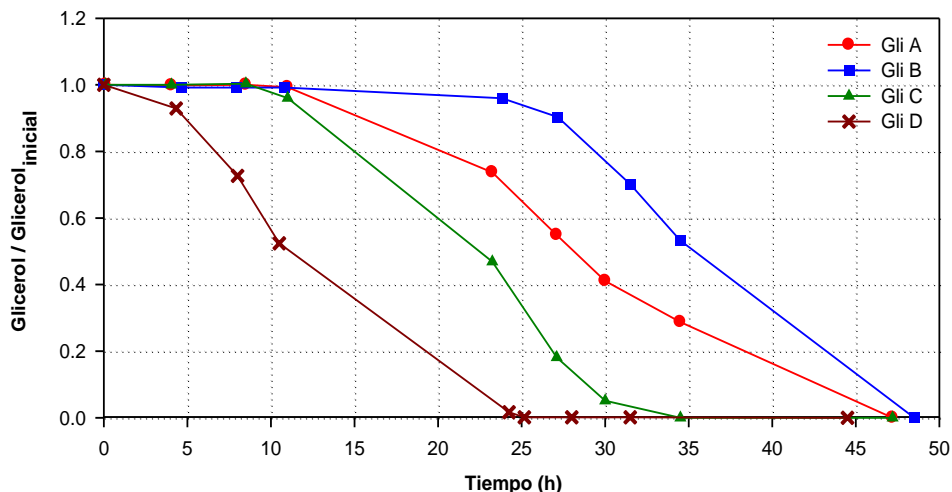


Figura 4.1: Evolución de la concentración relativa de glicerol en cultivos en erlenmeyer con el fenotipo Mut⁺ de *P. pastoris* empleando como sustratos glicerol crudo (A, B y D) y glicerol puro (C).

En la figura 4.2 se relaciona la evolución de la concentración de biomasa en función del tiempo, como era de esperar, las curvas se corresponden con las de consumo de glicerol. La mayor concentración de biomasa se consigue con los sustratos B y D (del orden de 7 g/L), siendo los valores obtenidos en los ensayos con glicerol puro (C) y glicerol de tipo A inferiores (5.3 g/L). Esta diferencia se encuentra motivada por la presencia de otras fuentes de carbono conjuntamente con el glicerol, entre ellas el metanol.

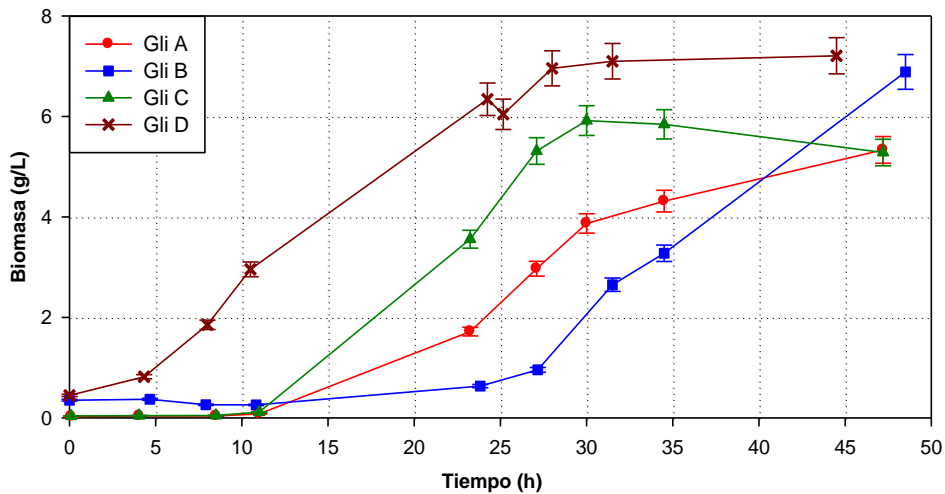


Figura 4.2: Evolución de la concentración de biomasa en cultivos en erlenmeyer con el fenotipo Mut^+ de *P. pastoris* empleando como sustratos glicerol crudo (A, B y D) y glicerol puro (C).

En la figura 4.3 se presenta la evolución de la concentración de metanol relativa. La asimilación del metanol se inicia una vez se ha consumido mayoritariamente el glicerol, demostrándose el efecto de represión del P_{AOX1} en presencia de este sustrato. Solamente cuando la concentración de glicerol es baja se observa el inicio del consumo de metanol debido a la desrepresión del promotor P_{AOX1} . Las variaciones observadas en la concentración del metanol antes de consumirse el glicerol están asociadas a problemas de desabsorción (*stripping*) de este sustrato volátil.

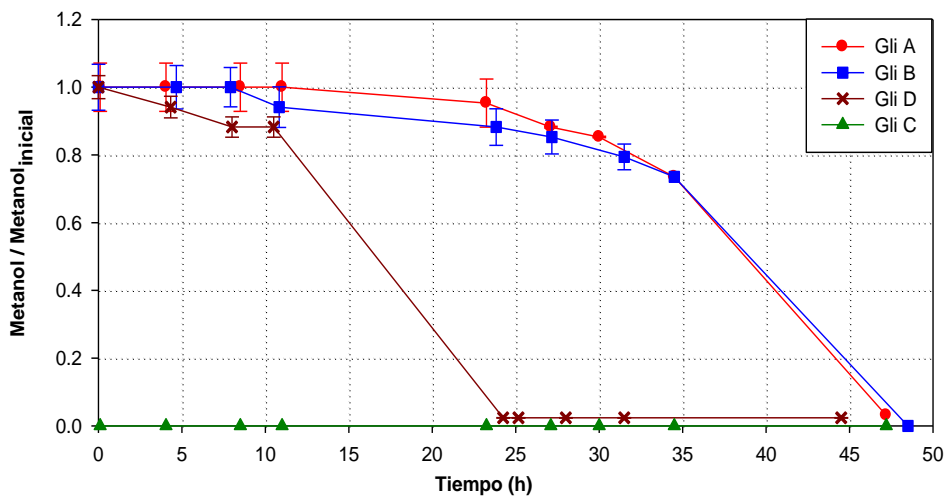


Figura 4.3: Evolución de la concentración relativa de metanol en cultivos en erlenmeyer con el fenotipo Mut^+ de *P. pastoris* empleando como sustratos glicerol crudo (A, B y D) y glicerol puro (C).

La baja frecuencia de muestreo y las condiciones de experimentación en erlenmeyer hacen difícil realizar una correcta determinación de la máxima velocidad específica de crecimiento. No obstante, se puede indicar que para los sustratos A, B y D los valores se encuentran en un rango entre 0.17 y 0.21 h⁻¹ muy similar al sustrato C (glicerol puro) cuya $\mu_{\text{máx}}$ fue de 0.18 h⁻¹.

Por lo que respecta al rendimiento biomasa sustrato ($Y_{X/S}$) el valor, en todos los casos, está comprendido entre 0.45 g/g para glicerol C (puro) y 0.5 g/g para los gliceroles con presencia de metanol. Este valor mayor se justifica por la generación de biomasa a partir de las otras fuentes de carbono, mayoritariamente metanol, presentes en el medio. Por consiguiente, la utilización de glicerol residual de la industria de biodiesel parece no tener un efecto negativo sobre el crecimiento de *P. pastoris*,

Para realizar un estudio con las condiciones ambientales más controladas se llevaron a cabo experimentos en discontinuo en un biorreactor de 5 L. Desafortunadamente, sólo se pudo utilizar como glicerol residual el D debido a que la empresa Bionet S.A que proporcionó las muestras A y B cesó en sus actividades.

4.3.3 Cultivos en Discontinuo en Biorreactor

Los ensayos en discontinuo se llevaron a cabo como se describe en el apartado 3.3.2 y los medios de cultivo se prepararon como se refiere en el apartado 3.1.3 Medio de cultivo BMC; para este sistema se realizaron cuatro ensayos haciendo variaciones en la fuente de carbono utilizada: Glicerol puro, glicerol crudo, sustrato mixto (glicerol puro – metanol puro) y por último sustratos mixtos (glicerol crudo – metanol puro). Estos cultivos permitieron observar el comportamiento de la cepa ante los diferentes orígenes y combinaciones de fuentes de carbono en el medio.

Las condiciones de operación de los cultivos en discontinuo se mantuvieron a una temperatura de 30°C, pH controlado a 5.5 adicionando KOH 1M, velocidad de agitación de 500 a 800 rpm y un flujo de aire a 1vvm para mantener el cultivo por encima del 20 % de oxígeno disuelto.

Como experimento de referencia se realizó un cultivo en discontinuo utilizando glicerol puro como única fuente de carbono a una concentración inicial de 14 g/L. La evolución de las principales variables de fermentación se presenta en la figura 4.4. El tiempo de latencia fue inferior a tres horas alcanzándose una concentración máxima de biomasa de 7.8 g/L. El cese del crecimiento celular que se observa después de las 20 h se debe al agotamiento de la fuente de carbono. El rendimiento $Y_{X/S}$ obtenido es de 0.48 g/g y la velocidad específica de crecimiento máxima de 0.18 h^{-1} . Estos resultados se encuentran en consonancia con los publicados en la bibliografía (Cos et al., 2005b).

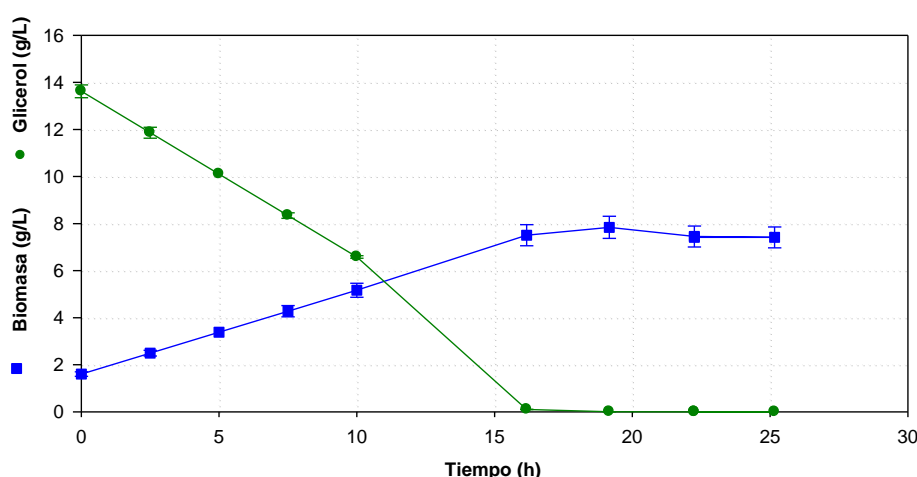


Figura 4.4: Evolución de la concentración de biomasa (■) y glicerol (●), en una fermentación en discontinuo con el fenotipo Mut^+ de *P. pastoris* utilizando glicerol puro como única fuente de carbono.

El siguiente experimento se realizó utilizando como fuente de carbono el glicerol crudo (glicerol D) a una concentración de 25 g/L, el cual lleva asociado una concentración de metanol de 1.7 g/L. los resultados se muestran en la figura 4.5. Si bien parece existir un ligero consumo de metanol conjuntamente con el de glicerol durante las primeras 10 h, este descenso de metanol puede deberse al efecto de *stripping* que se produce en el sistema.

Para caracterizar el proceso de pérdida de metanol por desabsorción se realizaron experimentos en biorreactor con medio de cultivo conteniendo metanol en concentraciones dentro del rango de trabajo y a las condiciones de operación estándar incluyendo temperatura, agitación, aireación y sistema de condensación de gases de salida. Se determinó la velocidad de desabsorción como la pérdida de metanol en el medio líquido de manera proporcional a su concentración: $r_{des} = -K_{st} \cdot S$; donde S:

concentración de sustrato; K_{st} : constante de des-absorción. Esta velocidad se puede considerar posteriormente en un balance de metanol para proceder a la estimación de la velocidad real de consumo de metanol.

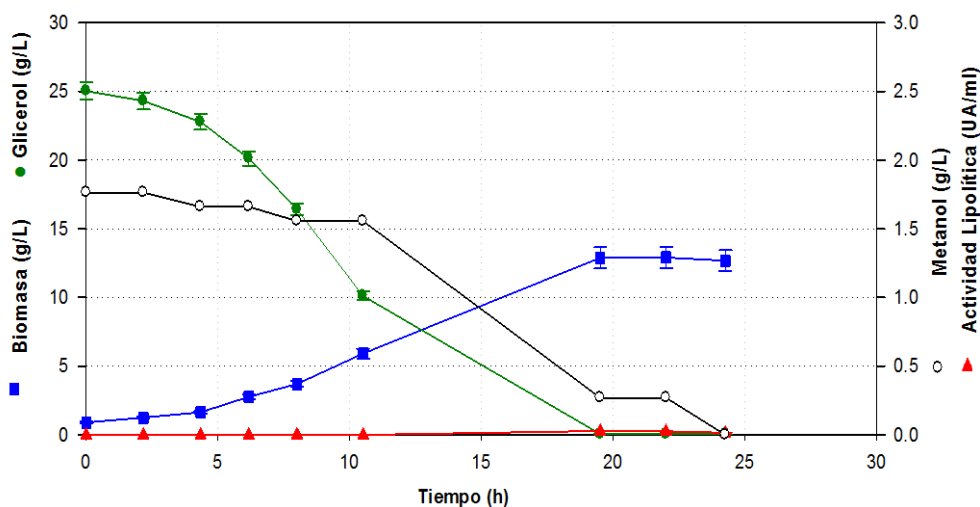


Figura 4.5: Evolución de la concentración de biomasa (■), glicerol (●), metanol (○) y actividad lipolítica (▲), en una fermentación en discontinuo con el fenotipo Mut⁺ de *P. pastoris* utilizando glicerol crudo de biodiesel como fuente de carbono.

Nuevamente, se observa el efecto represor del glicerol sobre el P_{AOX1} , lo que imposibilita el consumo de metanol hasta que la concentración de glicerol es cercana a cero (figura 4.5). No obstante, a diferencia de la anterior fermentación en la que el sustrato no tenía presencia de metanol, al final de esta fermentación se detectan niveles de actividad del orden de 0.04 U/mL, en el límite de detección del análisis. Ello indica el inicio de la producción de la lipasa recombinante por efecto del metanol que lleva asociado el sustrato una vez desreprimido el P_{AOX1} .

En este ensayo se alcanzó una biomasa de 12.7 g/L, lo que supone un rendimiento Y_{XS} de 0.51 g/g. Este valor es mayor que el obtenido con glicerol puro ya que no se ha tenido en cuenta el aporte de metanol como fuente de carbono. Considerando un rendimiento biomasa-metanol (Y_{Xmet}) de 0.3 g/g y descontando la biomasa obtenida en base a este rendimiento, el rendimiento referido sólo al glicerol es de 0.49 g/g, muy similar al obtenido previamente con glicerol puro. Por lo que respecta a la máxima velocidad específica de crecimiento obtenida sobre glicerol crudo su valor es de 0.20 h^{-1} , del mismo orden de magnitud que la obtenida con el

glicerol puro. Definitivamente no se observa un efecto negativo al utilizar glicerol crudo proveniente de la producción de biodiesel, en términos de rendimiento y velocidad específica de crecimiento, únicamente apuntar que parece aumentar ligeramente el tiempo de latencia al utilizar glicerol crudo.

Una vez comprobada la viabilidad de utilizar glicerol crudo para el crecimiento de *P. pastoris* se realizaron dos nuevas fermentaciones con ambos tipos de glicerol pero aumentando la concentración de metanol hasta unos niveles aproximados de 9 g/L con objeto de estar por debajo de la concentración a partir de la cual se produce la inhibición del crecimiento de *Pichia*. Al aumentar la concentración del sustrato inductor se espera alcanzar niveles de actividad lipolítica superiores al límite de detección obtenidos en el experimento anterior en que la concentración de metanol era baja (1.7 g/L). En la figura 4.6 se muestra la evolución de las principales variables analizadas (biomasa, sustrato y producto) utilizando glicerol puro y metanol.

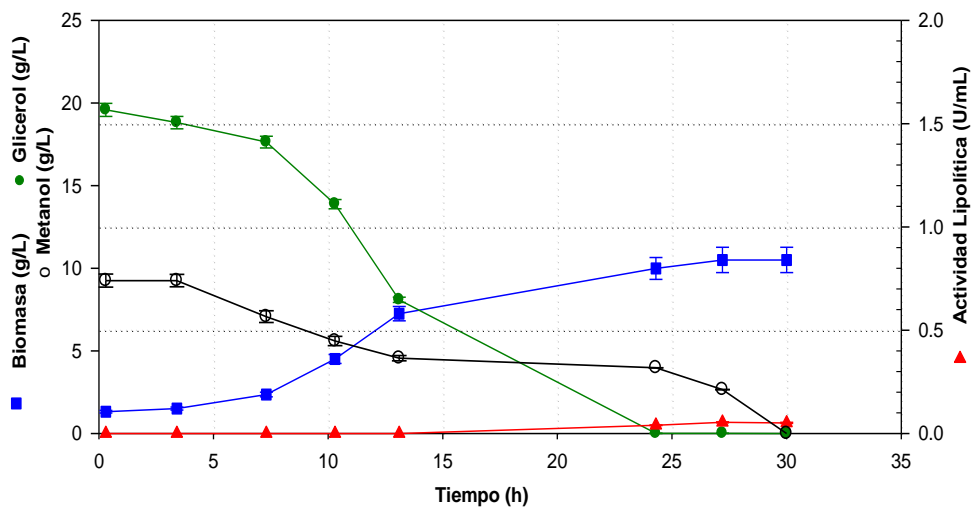


Figura 4.6: Evolución de la concentración de biomasa (■), glicerol (●), metanol (○) y actividad lipolítica (▲), en una fermentación en discontinuo con el fenotipo Mut⁺ de *P. pastoris* utilizando glicerol puro y metanol puro como fuentes de carbono.

Los resultados en términos de actividad fueron similares al anterior experimento, no apreciándose un aumento a pesar de tener una mayor concentración de metanol disponible. No obstante, hay que tener en cuenta que durante las primeras 15 horas se ha consumido prácticamente el 70 % de metanol, probablemente está asociado a las pérdidas de metanol por *stripping*, esta fuente de carbono no puede

haber sido consumido por el microorganismo debido a la alta concentración de glicerol todavía presente en el medio. Esta pérdida de metanol justifica los bajos niveles de actividad detectados y muestra la imperiosa necesidad de tener muy bien controlado todo el sistema de condensación de vapores en los gases de salida, para evitar lo máximo posible la pérdida de metanol por esta vía.

Por lo que respecta al rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$) y a la máxima velocidad específica de crecimiento observados, como era de esperar, los valores alcanzados son similares a los anteriores experimentos sobre glicerol 0.49 g/g y $\mu_{m\acute{a}x}$ de 0.19 h^{-1} .

Finalmente, se realizó un ensayo discontinuo con sustratos mixtos, glicerol crudo suplementado con metanol puro hasta alcanzar una concentración aproximada de 9 g/L. Los resultados se presentan en la figura 4.7. A nivel de rendimiento biomasa - glicerol y máxima velocidad específica de crecimiento no se observan diferencias significativas con los obtenidos en el experimento previo utilizando glicerol y metanol puro $Y_{x/s} = 0.49\text{ g/g}$ y $\mu_{m\acute{a}x} = 0.18\text{ h}^{-1}$.

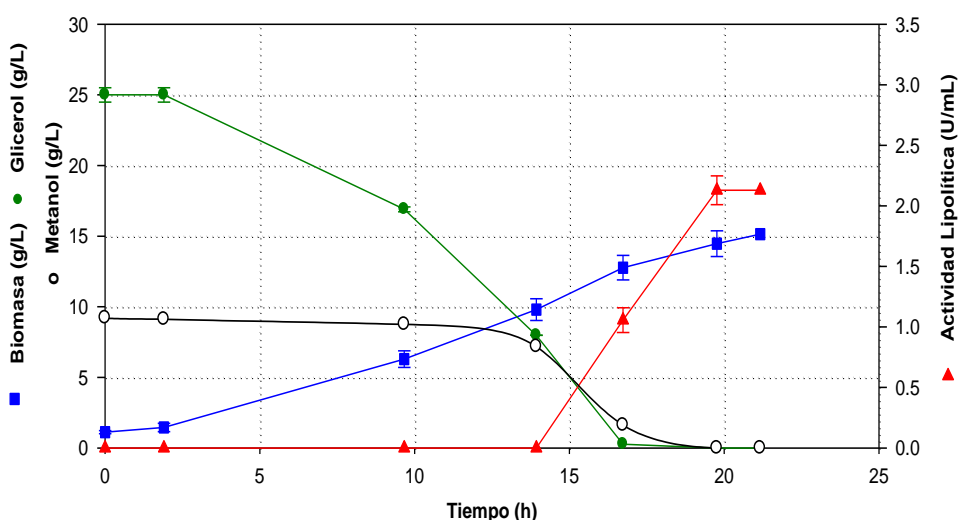


Figura 4.7: Evolución de la concentración de biomasa (■), glicerol (●), metanol (○) y actividad lipolítica (▲), en una fermentación en discontinuo de la cepa Mut⁺ de *P. pastoris* utilizando glicerol crudo y metanol puro como fuentes de carbono.

La diferencia más significativa son los niveles de actividad lipolítica detectados, 2.5 U/mL. En este experimento con la finalidad de minimizar la pérdida de metanol por efectos del *stripping* se utilizó un condensador para un reactor con capacidad de 7 L.

Se observó que el efecto de *stripping* fue mínimo y los niveles de metanol presentes en el medio una vez se ha consumido el glicerol son del orden de 8 g/L. Con esta concentración los niveles de ROL detectados son significativamente mayores que en el anterior experimento, donde una gran parte del metanol se había perdido por efecto del *stripping*.

Los niveles de actividad obtenidos previamente por el grupo de investigación utilizando únicamente metanol puro a la misma concentración en medio BMC (Cos et al., 2005a) fueron de 6 U/mL, más del doble de lo alcanzado utilizando sustratos mixtos. Su justificación puede estar relacionada con la presencia de glicerol como cosustrato que puede afectar parcialmente de forma negativa los niveles de producción. Además, hay que hacer constar que la concentración de biomasa inicial cuando sólo se tiene metanol como fuente de carbono es diferente, siendo mayor en el caso de sustratos mixtos, por lo que la concentración de metanol por gramo de biomasa presente en el medio es menor en este caso.

La biomasa alcanzada con el glicerol crudo fue más alta que para el ensayo con fuentes de carbono puras. Esto puede explicarse debido al contenido de impurezas existentes en el glicerol crudo que han sido utilizadas para el crecimiento y desarrollo de las células (Anastácio et al., 2014). Los resultados obtenidos en las fermentaciones en discontinuo se encuentran resumidos en la tabla 4.2, donde se presentan los valores de actividad lipolítica máxima, velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) y rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$) obtenidos.

A partir de los experimentos en discontinuo se puede concluir que no hay un efecto negativo del glicerol crudo proveniente de la producción de biodiesel en el crecimiento de *P. pastoris*, ni tampoco de manera importante en los niveles de producción del producto heterólogo.

Tabla 4.2: Comparación de los parámetros de fermentación de *P. pastoris* fenotipo Mut⁺ en cultivos en discontinuo utilizando fuentes de carbono simples y mixtas.

Cultivo	GP	GC	GP + MP	GC + MP
Metanol (g/L)	0.0	1.7	9.2	9.2
Glicerol (g/L)	14	25	19.6	25
Biomasa Final (g/L)	7.8	12.7	12.7	15.1
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0.18	0.20	0.19	0.18
Actividad Máx. (U/mL)	0.00	0.04	0.05	2.38
$Y_{x/gli}$ (g/g)	0.48	0.49	0.49	0.49

GP: Glicerol Puro, GC: Glicerol Crudo, MP: Metanol Puro

4.3.4 Cultivo Semicontinuo en Biorreactor

Finalmente se realizó una fermentación utilizando como estrategia de operación un cultivo en semicontinuo controlando los niveles de metanol en el medio de cultivo a una consigna de 2 g/L. Esta estrategia de cultivo es una de las más utilizadas en la producción de proteínas heterólogas con *P. pastoris*, donde se obtiene una alta densidad celular, permitiendo conseguir altos niveles de proteína recombinante (Barrigón et al., 2013). El principal objetivo de este apartado fué determinar el efecto de la utilización de glicerol crudo en el proceso de producción de la proteína recombinante ROL en un cultivo en semicontinuo.

La fermentación se llevó a cabo como se describe en el apartado 3.3.3, los medios utilizados se describen en el apartado 3.1.3 utilizando como fuente de carbono para este caso, el glicerol crudo en las fases discontinua y de transición. La fermentación en semicontinuo se compone de 3 fases; una de crecimiento celular denominada fase discontinua (D), una segunda fase de transición (T) y una tercera fase de alimentación con metanol, denominada fase de inducción (I). La evolución de las variables más importantes se muestra en la figura 4.8, en las cuales se pueden observar dos líneas discontinuas en posición vertical que indican la separación entre las tres fases del cultivo.

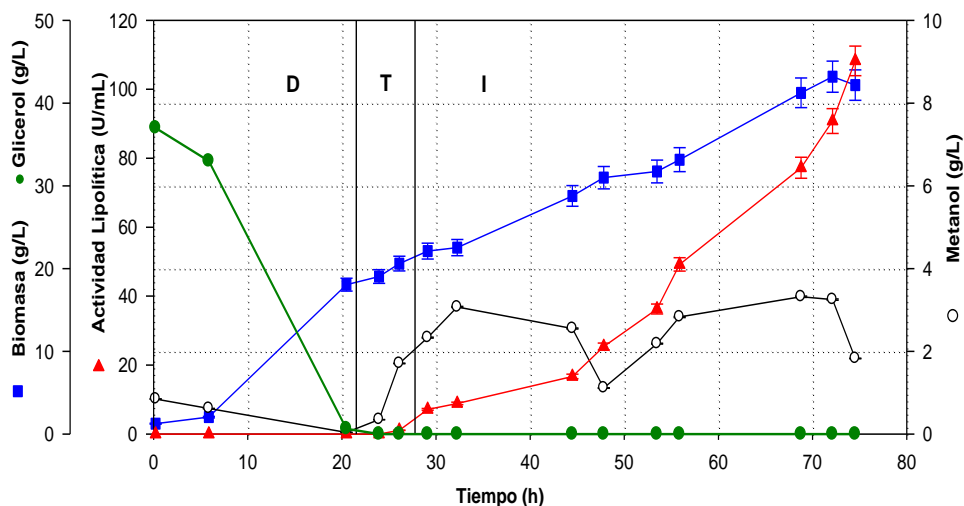


Figura 4.8: Evolución de la concentración de biomasa (■), glicerol (●), metanol (○) y actividad lipolítica (▲) en una fermentación en semicontinuo alimentado con metanol a una concentración de 2 g/L utilizando glicerol crudo de biodiesel como fuente de carbono en las fases D y T.

En la figura 4.8 se presenta la evolución de la concentración de biomasa, metanol, glicerol y la actividad lipolítica extracelular. Variables que fueron evaluadas a partir de muestras extraídas periódicamente durante la fermentación, utilizando la metodología descrita en el apartado 3.4. Como se observa en la figura 4.8, en el período correspondiente a la fase D se utilizaron 37 g/L de glicerol crudo que fueron consumidos aproximadamente en las primeras 20 h de fermentación. El agotamiento final de la fuente de carbono en esta fase se evidencia por un incremento en los valores de oxígeno disuelto. La función de esta fase es conseguir una rápida generación de biomasa.

Los datos obtenidos a partir de los análisis de HPLC muestran una concentración inicial de metanol en esta fase de 0.85 g/L, el cual está presente en el glicerol crudo obtenido como subproducto en el proceso de producción de biodiesel. Esta concentración de metanol no posee un impacto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de *Pichia*. El consumo de este metanol se inicia cuando se ha agotado casi completamente el glicerol en el medio de cultivo (figura 4.8) comportamiento similar a lo observado en los cultivos en discontinuo utilizando sustratos mixtos.

Durante esta fase el comportamiento del cultivo fue idéntico a los cultivos en discontinuo de *Pichia* creciendo sobre glicerol crudo descritos anteriormente. En la producción de biomasa se observa un período de latencia de menos de 3 h, alcanzando un valor de 18 g/L al final. El rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$) en esta fase fue de 0.49 g/g_{gli}, siendo ligeramente inferior al de un cultivo similar donde se obtuvo un valor de 0.5 g/g_{gli}, el cual es el valor publicado para el crecimiento del microorganismo cuando se utiliza como fuente de carbono glicerol puro en las mismas condiciones (Cos et al., 2005a). El rendimiento es el mismo al observado en cultivos en discontinuo descritos en este mismo capítulo (tabla 4.2) utilizando un medio de cultivo para discontinuo con glicerol crudo como fuente de carbono.

La fase de transición (T), se inicia una vez consumido completamente el glicerol adicionado inicialmente. En esta fase se produce un cambio de la alimentación de forma gradual, pasando de una alimentación exclusiva con glicerol a una

alimentación mixta con glicerol y metanol, siguiendo el esquema modificado de Katakura et al., (1998). El objetivo de esta fase es minimizar el tiempo de adaptación del cambio metabólico que *Pichia* tiene que realizar para el consumo de metanol como sustrato inductor. Esta fase consiste en alimentar glicerol y metanol durante 5 h manteniendo el siguiente esquema. En las dos primeras horas el glicerol fue alimentado a una velocidad de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, luego se disminuyó a 160 $\mu\text{L}/\text{min}$ en la tercera hora, a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ en la cuarta hora y finalmente a 65 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante la hora final. Con esta estrategia se consigue que el glicerol se encuentre siempre como sustrato limitante, encontrándose el promotor P_{AOX1} desreprimido y por consiguiente en condiciones de asimilar metanol. La alimentación con metanol fue iniciada en la tercera hora a un caudal constante de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ hasta el final de esta fase (Minning et al., 2001; Cos et al., 2005a).

Por lo que respecta al caudal de metanol seleccionado, está pensado para que en el caso de que durante este tiempo todavía no se haya iniciado el consumo del metanol, al final de esta fase la acumulación del mismo no supere los 5 g/L, encontrándose por debajo de la concentración de inhibición del crecimiento del microorganismo. Al final de esta fase se observó que la concentración de metanol máxima que se alcanzó fue de 2 g/L, este hecho conjuntamente con la detección de niveles de actividad lipolítica confirman que el microorganismo ya tiene adaptado su metabolismo al consumo de metanol y a la producción del producto heterólogo.

Uno de los parámetros más importantes en el sistema de expresión de *P. pastoris* basado en P_{AOX1} es la concentración de metanol. Un seguimiento y control de esta variable de operación es primordial ya que altos niveles de este sustrato inductor pueden ser tóxicos para las células. De este modo, mantener una concentración de metanol constante durante la fase de inducción tiene efectos positivos en la producción de la proteína heteróloga (Zhang et al., 2000).

En la fase de inducción (I), se alimenta al microorganismo exclusivamente con metanol, intentando mantener una concentración de metanol de 2 g/L en el medio de cultivo. Para mantener esta concentración se realiza una adición de metanol de caudal variable (figura 4.9), por la acción de un control predictivo acoplado a un controlador PI previamente desarrollado en el grupo de investigación a partir de la medida en línea de

la concentración de metanol (Cos et al., 2006; Barrigón et al., 2013). Para analizar mejor el bioproceso se calcularon parámetros de rendimiento durante la fase I, como el rendimiento de células generadas por cantidad de sustrato consumido ($Y_{x/s}$) y la cantidad de producto formado por biomasa generada ($Y_{p/x}$) que se presentan en la tabla 4.3. La metodología de cálculo para estas variables se describe en el apartado 3.5.

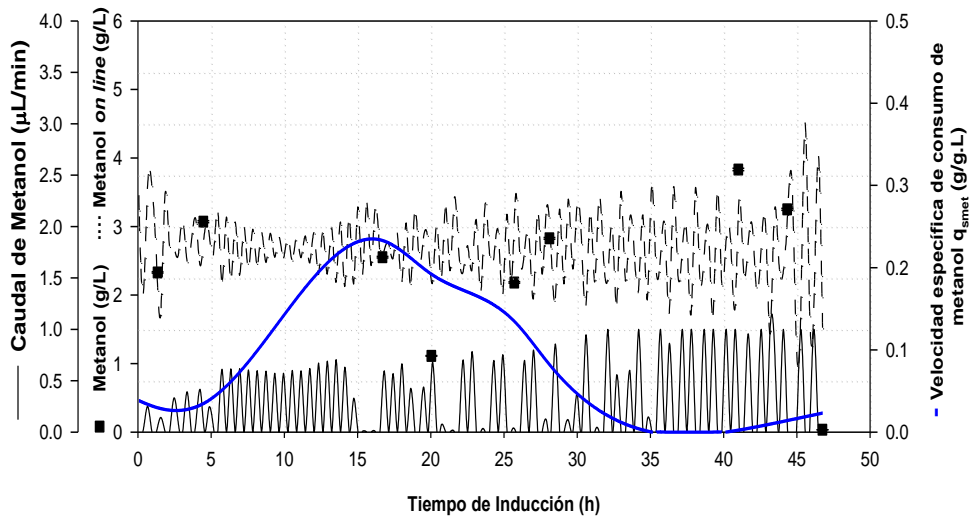


Figura 4.9: Evolución de la concentración de metanol (■), concentración de metanol *on line* (···), caudal de adición de metanol (—) y velocidad específica de consumo de metanol q_s (—) a lo largo de la fase de inducción en una fermentación en semicontinuo alimentado con metanol a una concentración de 2 g/L.

A lo largo de la fase de inducción se observó mediante análisis *off-line* por HPLC de la concentración de metanol, que su valor oscilaba entre 1.0 y 3.8 g/L con variaciones mayores a medida que se avanzaba en la fase de inducción, siendo la consigna de metanol seleccionada de 2 g/L.

El problema observado en el control de metanol se debió fundamentalmente a una incorrecta sintonía de los parámetros del controlador, a su puesta a punto al cambiarse de fermentador, ya que el sistema fue desarrollado inicialmente para el equipo Biostat ED (Ramon et al., 2004), y a problemas con la sonda de metanol. Debido a que la relación entre el voltaje obtenido por la sonda y la concentración de metanol es exponencial, si la sonda no se calibra convenientemente dentro del rango de trabajo los errores pueden ser muy importantes.

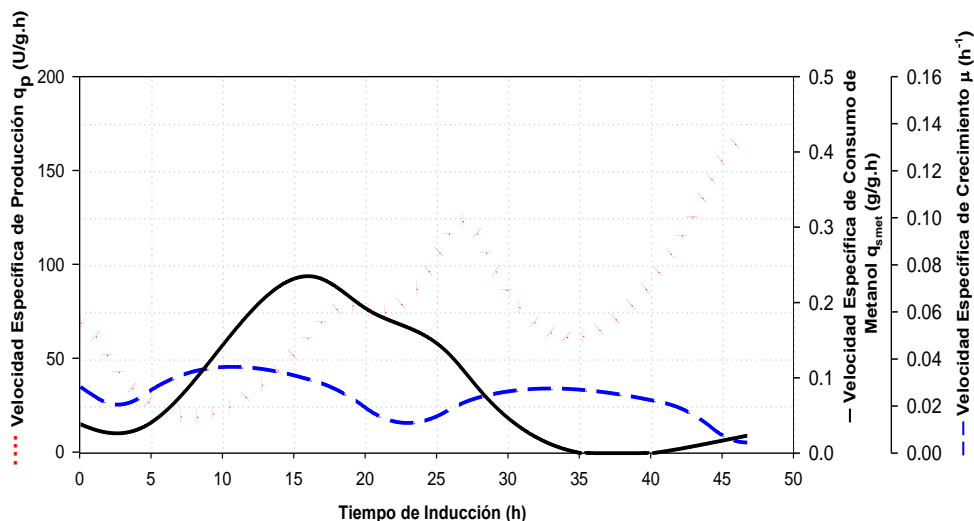


Figura 4.10: Evolución de las velocidades específicas q_p (●●●), μ (- -) y q_s (—) a lo largo de la fase de inducción en una fermentación en semicontinuo alimentado con metanol a una concentración de 2 g/L utilizando glicerol crudo de biodiesel como fuente de carbono en las fases D y T.

Por lo que respecta a la evolución de la biomasa, su comportamiento fue el esperado, alcanzándose un valor máximo de 43.2 g/L a las 72 h de cultivo. En la evolución de la velocidad específica de crecimiento se observan fluctuaciones alrededor del valor medio de $0.024 h^{-1}$ (Figura 4.10), siendo inferior a lo obtenido en trabajos anteriores realizados en el grupo de investigación (tabla 4.3). Las fluctuaciones observadas en la estimación de la μ fueron causadas probablemente por los problemas asociados al control de la concentración de metanol descrito antes. La velocidad específica de consumo de metanol ($q_{s,met}$) inicialmente presentó un incremento alcanzando un pico máximo a las 16 h de inducción, luego descendió hasta alcanzar valores muy inferiores, con un valor medio de $0.11 g_{met}/g \cdot h$ siendo este valor 1.3 veces inferior al alcanzado por Cos et al., (2005b) trabajando con un controlador manual de la concentración de metanol.

Haciendo referencia al producto recombinante de interés, la actividad lipolítica aumenta durante la fase de inducción del cultivo, presentando un valor máximo de 108 U/mL al final del cultivo (Figura 4.8), el valor obtenido del rendimiento productivo-biomasa ($Y_{P/X}$) es 1.3 veces superior a lo reportado por Barrigón et al., (2013) para la misma consigna de metanol aunque lejos del obtenido para una consigna de tres gramos litros, pero es similar al valor reportado por Cos et al., (2005b) utilizando un control manual de metanol (tabla 4.3).

En la figura 4.10 se observa la evolución de la velocidad específica de producción extracelular (q_p) de la lipasa. Si bien se detecta un incremento de la actividad en las primeras horas de inducción, posteriormente durante 10 horas se observa una parada en la producción lo que se corresponde con un mínimo de q_p a las 10 horas del inicio de la inducción. Posteriormente esta velocidad alcanza valores siempre superiores a 60 U/g-h, aunque con fluctuaciones probablemente debidas a los problemas con el mantenimiento de la consigna de metanol lo que afecta al consumo de este sustrato y por consiguiente a la producción del producto heterólogo (Arnau et al., 2010).

Al comparar la evolución de las velocidades específicas en los diferentes trabajos realizados por el grupo de investigación (tabla 4.3), se puede observar que la velocidad específica de crecimiento media de este trabajo es 1.5 veces menor que la obtenida en el trabajo de Cos et al., (2005b) utilizando un control manual de metanol a la misma consigna. Al compararlo con el trabajo de Barrigón et al., (2013) a 2 g/L se muestra que son 1.8 veces inferior los resultados obtenidos en este trabajo al igual que cuando se utilizó metanol a una constante de 3 g/L. Un comportamiento igual se observa con respecto a la velocidad específica de consumo de sustrato y a la velocidad específica de producción, observándose mayores valores en los resultados obtenidos en los trabajos realizados por Cos, et al., (2005b) y Barrigón et al., (2013).

En la misma tabla, si se comparan los parámetros relacionados con la producción, se observa que el rendimiento producto biomasa es mayor en este trabajo que en lo reportado en el trabajo de Cos et al., (2005b), (1.04 veces) y Barrigón et al., (2013), (1.3 veces) utilizando como consigna metanol a una concentración de 2 g/L. Esto es lo contrario a lo observado por Barrigón et al. (2013) cuando se incrementa la consigna a 3 g/L de metanol, siendo ésta 2.1 veces mayor que la obtenida en este trabajo. En cuanto a la productividad volumétrica y específica se puede observar que se obtienen valores similares en los trabajos realizados por Cos et al., (2005b), y por Barrigón et al., (2013), utilizando una concentración de 2 g/L de metanol, siendo éstos valores aproximadamente 1.4 veces superior a lo obtenido en este trabajo.

En conclusión, el cultivo realizado con glicerol crudo como fuente de carbono en las fases discontinua y de transición en un cultivo en semicontinuo presenta un

comportamiento similar a los previamente realizados utilizando glicerol puro. Probablemente, las discrepancias observadas en el periodo de inducción se debieron fundamentalmente a los errores en el mantenimiento de la consigna de metanol. Por todo ello, se puede concluir que el glicerol crudo es una fuente de carbono útil y válida para la producción de la proteína ROL en *P. pastoris*.

Tabla 4.3: Resultados comparativos de parámetros y variables asociadas a la fermentación en semicontinuo de *P. pastoris* produciendo la proteína ROL bajo el control del promotor P_{AOX1} .

Variables	Glicerol crudo de biodiesel y Metanol 2 g/L	Cos et al., 2005b MeOH Control manual	Barrigón et al., 2013 MeOH 2 g/L	Barrigón et al., 2013 MeOH 3 g/L
Actividad Máx. (U/mL)	108	150	103	280
$Y_{P/X}$ (U/g)	2567	2470	2004	5282
Productividad (U/L·h)	1452	3000	2437	5406
Productividad esp. (U/g·h)	34	49	48	102
μ_{media} (h^{-1})	0.024	0.036	0.043	0.046
qs media (g/g·h)	0.11	0.14	0.19	0.20
qp media (U/g·h)	72	130	106	322

4.4 Conclusiones

El glicerol crudo proveniente de la industria del biodiesel sin una purificación adicional permite el crecimiento de *P. pastoris* con el fenotipo Mut⁺ en cultivos en erlenmeyers y en biorreactor en modo discontinuo.

Cuando se realizó un cultivo en biorreactor en modo semicontinuo, los resultados obtenidos con la utilización de este sustrato en las fases de discontinuo y transición permiten concluir que no tiene un efecto negativo en la producción de ROL.

Por consiguiente, se ha demostrado que la utilización de glicerol crudo, producto residual de la industria del biodiesel, es viable en el proceso de producción de proteínas recombinantes mediante la factoría celular *P. pastoris*. Esto comportaría un considerable ahorro económico, ya que ello supondría reducir los costes de producción, aumentando la sostenibilidad medioambiental y económica de la industria del biodiesel.

4.5 Bibliografía

- Anand, P., y Saxena, R. K. (2012). A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. *New Biotechnology*, 29(2), 199–205.
- Anastácio, G. S., Santos, K. O., Suarez, P. A. Z., Torres, F. A. G., De Marco, J. L., y Parachin, N. S. (2014). Utilization of glycerin byproduct derived from soybean oil biodiesel as a carbon source for heterologous protein production in *Pichia pastoris*. *Bioresource Technology*, 152, 505–10.
- Arnau, C., Ramon, R., Casas, C., y Valero, F. (2010). Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(6), 494–500.
- Barrigón, J. M., Montesinos, J. L., y Valero, F. (2013). Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut⁺ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures?. *Biochemical Engineering Journal*, 75, 47–54.
- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., y Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36(2), 1097–1108.
- Chi, Z., Pyle, D., Wen, Z., Frear, C., y Chen, S. (2007). A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochemistry*, 42(11), 1537–1545.
- Cos, O., Resina, D., Ferrer, P., Montesinos, J. L., y Valero, F. (2005a). Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 26(2-3), 86–94.
- Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J. L., Ferrer, P., Cregg, J. M., y Valero, F. (2005b). Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 116, 321–335.
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., y Valero, F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microbial Cell Factories*, 5, 17.
- Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K., y Chappell, T. (2009). Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods in enzymology* (1st ed., Vol. 463). Elsevier Inc.
- Da Silva, G. P., Mack, M., y Contiero, J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), 30–9.
- Eda, C., Ozbay, N., Oktar, N., y Calık, P. (2008). Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. *Ind. Eng. Chem. Res*, 47, 2985–2990.
- Hájek, M., y Skopal, F. (2010). Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Bioresource Technology*, 101(9), 3242–5.

- Katakura, Y., Zhang, W., Zhuang, G., Omasa, T., Kishimoto, M., Goto, Y., y Suga, K.-I. (1998). Effect of methanol concentration on the production of human Pz-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(5), 482–487.
- Liu, X., Jensen, P. R., y Workman, M. (2012). Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Bioresource Technology*, 104, 579–86.
- Liu, Y.-P., Sun, Y., Tan, C., Li, H., Zheng, X.-J., Jin, K.-Q., y Wang, G. (2013). Efficient production of dihydroxyacetone from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Gluconobacter frateurii*. *Bioresource Technology*, 142C, 384–389.
- Ma, F., y Hanna, M. A. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 70, 1–15.
- Metsoviti, M., Paraskevaidi, K., Koutinas, A., Zeng, A.-P., y Papanikolaou, S. (2012). Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. *Process Biochemistry*, 47(12), 1872–1882.
- Minning, S., Serrano, A, Ferrer, P., Solá, C., Schmid, R. D., y Valero, F. (2001). Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 86(1), 59–70.
- Pflügl, S., Marx, H., Mattanovich, D., y Sauer, M. (2014). Heading for an economic industrial upgrading of crude glycerol from biodiesel production to 1,3-propanediol by *Lactobacillus diolivorans*. *Bioresource Technology*, 152, 499–504.
- Ramon, R., Feliu, J. X., Cos, O., Montesinos, J. L., Berthet, F. X., y Valero, F. (2004). Improving the monitoring of methanol concentration during high cell density fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 26(18), 1447–52.
- Tang, S., Boehme, L., Lam, H., y Zhang, Z. (2009). *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 157–162.
- Thompson, J. C., y He, B. B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture*, 22(2), 261–265.
- Zhang, W., Inan, M., Meagher, M. M., y Inan, M. (2000). Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering*, 5, 275–87.

Capítulo 5

Producción de ROL recombinante en cultivos semicontinuos utilizando como estrategia de operación alimentación mixta a una velocidad específica de crecimiento fijada con glicerol y pulsos de metanol

Contenido

Producción de ROL recombinante en cultivos semicontinuos utilizando como estrategia de operación alimentación mixta a una velocidad específica de crecimiento fijada con glicerol y pulsos de metanol	89
5.1 Resumen	91
5.2 Introducción	93
5.3.1 Producción de ROL en cultivo semicontinuo alimentado con pulsos de metanol (10 g/L – 12h)	97
5.3.2 Producción de ROL en cultivo semicontinuo con sustratos mixtos: alimentación exponencial con glicerol ($\mu=0.1 \text{ h}^{-1}$) y pulsos de metanol a 10 g/L cada 2 h.....	99
5.3.3 Producción de ROL en cultivo semicontinuo con sustratos mixtos utilizando pulsos de metanol a diferente frecuencia y alimentación exponencial con glicerol a una velocidad específica de 0.02 h^{-1}	103
5.3.4 Comparación de los resultados utilizando la estrategia de alimentación con pulsos de metanol a diferentes concentraciones y frecuencia, alimentando glicerol como cosustrato a una velocidad de crecimiento de 0.02 h^{-1}	105
5.3.5 Pureza de la proteína recombinante obtenida durante los ensayos de alimentación con pulsos de metanol.....	109
5.4 Conclusiones	111
5.5 Bibliografía	112

Efecto de la alimentación con pulsos de metanol en la producción de ROL en cultivos semicontinuos utilizando como cosustrato glicerol a una velocidad específica de crecimiento fijada.

5.1 Resumen

El principal objetivo en el desarrollo de un bioproceso es la identificación y optimización de los parámetros del mismo, con la finalidad de obtener la mayor concentración y calidad del producto deseado. Dado que la producción de proteínas recombinantes es afectada principalmente por la estrategia de operación utilizada durante la inducción, los parámetros como la velocidad de alimentación del sustrato o la concentración del inductor juegan un papel importante para incrementar la productividad del bioproceso. En este trabajo se propone la utilización de glicerol como un cosustrato, para estudiar los efectos del consumo combinado de glicerol a una μ constante y pulsos de metanol, a diferente frecuencia, sobre el crecimiento y la producción de ROL en el sistema de expresión de *P. pastoris* fenotipo Mut⁺.

Para ello se realizaron varios cultivos con la estrategia en semicontinuo utilizando dos velocidades específicas de crecimiento preprogramadas en función del glicerol adicionado al medio (0.1 y 0.02 h⁻¹) y pulsos de metanol a dos concentraciones (10 y 5 g/L) y a diferentes periodos de adición (1, 2, 6, y 12 horas). En esta parte del trabajo, la concentración de metanol no fue medida *on line* durante la fermentación.

Inicialmente se realizó un cultivo en semicontinuo utilizando pulsos de metanol a 10 g/L cada 12 h. Una vez iniciada la fase de adición de pulsos de metanol los niveles de biomasa permanecieron prácticamente constantes, manteniéndose en un valor cercano a los 29 g/L, debido al poco metanol adicionado. Los resultados obtenidos indican que la estrategia de adición de metanol como único sustrato cada 12 horas mediante pulsos, no es eficaz, ya que los niveles alcanzados de ROL fueron bajos.

Seguidamente, se realizó un ensayo donde la alimentación con glicerol se efectuó mediante una adición exponencial preprogramada, manteniendo la velocidad específica de crecimiento a 0.1 h⁻¹ y pulsos de metanol a una concentración de 10

g/L cada 2 h, con esto se inició el estudio del efecto de fijar la velocidad específica de crecimiento del fenotipo Mut⁺ de *P. pastoris* para la producción de ROL en cultivo semicontinuo, utilizando un sistema de alimentación con sustratos mixtos (metanol y glicerol). Al utilizar una μ de 0.1 h⁻¹ con glicerol, hay un efecto positivo sobre el crecimiento de la biomasa que se incrementa progresivamente hasta alcanzar un valor de 68.1 g/L al final del cultivo. No obstante, en la evolución de la concentración de metanol se observó una acumulación progresiva después de 5 h de iniciada la fase de inducción. Este hecho indica que a partir de este punto el microorganismo es incapaz de consumir en 2 horas los 10 g/L de metanol adicionado en cada pulso. Con esta estrategia de sustratos mixtos se alcanzaron resultados de actividad lipolítica de 1.5 veces superiores que al emplear pulsos de metanol como único sustrato.

Por otro lado, se realizaron fermentaciones utilizando una velocidad específica de crecimiento de 0.02 h⁻¹ con glicerol. El metanol se adicionó a diferentes periodos de tiempo de adición y concentración de metanol; 10 g/L cada 12 h, 5 g/L cada 6 h y 5 g/L cada hora. En relación a la evolución de los niveles de lipasa extracelular, la concentración y el tiempo de los pulsos de metanol afectan a la producción de la proteína heteróloga. Sin embargo, el rendimiento producto-biomasa ($Y_{p/x}$), no mostró una clara diferencia entre los ensayos, evidenciando que la utilización de pulsos de metanol no supone una clara mejora en la producción de la proteína heteróloga, comparando con la fermentación cuando se utiliza metanol como única fuente de carbono en la etapa de inducción a una concentración de 2 g/L en el medio de cultivo (Barrigón et al., 2013).

5.2 Introducción

La estrategia de cultivo más utilizada para la producción de proteínas heterólogas con el sistema *P. pastoris* es la fermentación en semicontinuo alimentada con metanol, el cual actúa como inductor del promotor P_{AOX1} y como única fuente de carbono y energía en la etapa de inducción. Con este sistema se han reportado problemas operacionales importantes, como es el alto calor de combustión del metanol (-727 kJ/mol), que requiere de un rápido y eficiente sistema de enfriamiento, debido a que un incremento de la temperatura del cultivo puede afectar la productividad y calidad de la proteína recombinante y al crecimiento del microorganismo. Otro problema es el almacenamiento de grandes cantidades de metanol, que debe realizarse en instalaciones antideflagrantes, requiriendo de una gran inversión en el bioproceso. (Arnau et al., 2011).

La adición de metanol tiene que ser controlada ya que debe estar presente en cantidades suficientes para la expresión de genes heterólogos. Igualmente, este control es necesario para evitar la acumulación de metanol en el medio de cultivo hasta alcanzar niveles que resulten tóxicos para las células, esto puede ocasionar lisis celular y liberar proteínas no deseables (proteasas) al medio de cultivo, que afectan el crecimiento y la producción celular (D'Anjou y Daugulis, 2000).

Con la finalidad de superar los problemas relacionados con el uso de metanol, algunos autores han reportado que el uso de sustratos mixtos, durante la fase de inducción permite incrementar tanto la densidad celular como la productividad del bioproceso y reducir el tiempo de inducción en cultivos de *P. pastoris* (Files et al., 2001; Sagmeister et al., 2013). Los primeros ensayos en cultivos en semicontinuo realizados en este sentido fueron desarrollados por Brierley et al., (1990) y Loewen et al., (1997).

Uno de los cosustratos más utilizados en los procesos de inducción para la producción de proteínas recombinantes es el glicerol. La ventaja de utilizar glicerol como cosustrato es que la entalpía de combustión del glicerol es de -549.5 KJ/mol más baja que la entalpía de combustión del metanol. Debido a esto, el calor liberado utilizando sustratos mixtos es menor. De igual manera, el consumo de oxígeno es menor ya que la oxidación del glicerol requiere menos oxígeno que la oxidación del

metanol, reduciendo los problemas operacionales presentados al utilizar el fenotipo Mut⁺ alimentado únicamente con metanol. Por lo tanto, un método que redujera el calor generado y el consumo de oxígeno sin afectar la productividad podría claramente ser ventajoso (Loewen et al., 1997; Valero et al., 2013).

En experimentos en continuo, se ha demostrado que si bien el glicerol en exceso favorece el crecimiento celular, también es un fuerte represor del promotor P_{AOX1} , y en consecuencia un represor de la producción de la proteína heteróloga (Arnau et al., 2010). Por lo tanto, un parámetro clave a la hora de diseñar el proceso de producción mediante la utilización de glicerol, es evitar la represión del promotor P_{AOX1} con tal de maximizar la productividad del bioproceso (Zhang et al., 2005). Por este motivo, es importante garantizar una velocidad específica de crecimiento que no permita la acumulación de glicerol en el medio de cultivo. (D'Anjou y Daugulis, 2001).

Jungo et al., (2007), realizaron un estudio cuantitativo de la influencia de sustratos mixtos en la producción de avidina recombinante utilizando una cepa Mut⁺ de *P. pastoris*, encontrando que al utilizar una mezcla de glicerol-metanol en una proporción de 65 y 35 % respectivamente, no se detecta acumulación de sustratos en el medio de cultivo y bajo las condiciones de sustrato limitante las dos fuentes de carbono son consumidas simultánea y completamente.

Finalmente, como un antecedente de experimentos realizados en el grupo de investigación se utilizó el sistema de expresión con *P. pastoris* para la producción de la lipasa de *Rhizopus oryzae* bajo el promotor P_{AOX1} , desde el punto de vista de optimización de procesos biológicos, con los fenotipos Mut⁺ y Mut^s en estrategias en continuo y semicontinuo, empleando metanol como una única fuente de carbono en la etapa de inducción en trabajos realizados por Cos et al., (2005 y 2006) y utilizando estrategias alternativas de control por Surribas et al., (2007).

Ramón et al., (2007) realizaron un estudio utilizando sustratos mixtos con la finalidad de determinar el efecto de esta estrategia en cultivos en semicontinuo, sobre las velocidades de producción específicas utilizando los fenotipo Mut⁺ y Mut^s de *P. pastoris* y sorbitol como cosustrato. Se obtuvo un incremento significativo de las productividades específicas y volumétricas del bioproceso en comparación con la

utilización de metanol como única fuente de carbono sólo para el fenotipo Mut^s. Igualmente, Arnau et al., (2011) trabajando con sustratos mixtos (glicerol-metanol) reportan que el glicerol permite incrementar la velocidad específica de crecimiento en comparación con la utilización de sorbitol, en una cepa de *P. pastoris* fenotipo Mut^s. Además, cuando la relación de la μ de trabajo entre glicerol y metanol es superior a 4, se observa disminución en los parámetros relacionados con la producción y con el consumo de metanol. De la misma manera se observa que hay una disminución de la actividad lipolítica durante las últimas horas de cultivo, asociado a un incremento en la actividad proteolítica, lo cual no se observa cuando se trabaja con sorbitol como cosustrato.

En este capítulo se describe el uso de una técnica alternativa de cultivo en semicontinuo utilizando sustratos mixtos. La alimentación con metanol como única fuente de carbono es remplazada por una alimentación mixta, comparando el uso de glicerol a una μ constante y pulsos de metanol a diferente frecuencia, para intentar implementar una estrategia de operación muy sencilla, que no requiera de instrumentación compleja para la medida en línea de este sustrato.

5.3 Resultados y Discusión

Los experimentos realizados en referencia a los cultivos en semicontinuo han seguido el esquema propuesto en el apartado 3.3.3, modificando el cultivo durante la fase de inducción en la cual se utilizó sustratos mixtos, glicerol y metanol para el crecimiento y la producción de la proteína recombinante, las fuentes de carbono se prepararon como se describe en el apartado 3.1.2. Para la alimentación con glicerol se realizó una adición exponencial preprogramada para mantener una μ constante en cada ensayo realizado. Los valores utilizados para calcular el caudal inicial de glicerol fueron obtenidos utilizando la ecuación 3.2 descrita en el capítulo de materiales y métodos apartado 3.3.4. Los pulsos de metanol se adicionan de acuerdo a los requerimientos de cada cultivo, utilizando una microbureta controlada por ordenador con el programa *LabView 5.0*.

Se realizaron varios cultivos con la estrategia en semicontinuo utilizando dos velocidades específicas de crecimiento con adición de glicerol preprogramada (0.1 y 0.02 h^{-1}) y pulsos de metanol a dos concentraciones (10 y 5 g/L) en tiempos diferentes de adición (1 , 2 , 6 , y 12 horas). En estas fermentaciones la concentración de metanol no fue medida on line durante la fermentación.

En los experimentos realizados en este capítulo, las primeras 20 h corresponden a la fase discontinua, la función de esta fase es un rápido crecimiento de la biomasa utilizando glicerol como fuente de carbono. La utilización de esta fuente de carbono reprime la expresión de la proteína recombinante y por lo tanto el comportamiento de los diferentes cultivos en esta etapa es el mismo. El rendimiento biomasa sustrato en los cultivos en fase discontinua fue en promedio de $0.5 \text{ g/g}_{\text{gli}}$ comparables a los valores reportados por Cos et al., (2005). Las 5 h siguientes corresponden a la fase de transición que se inicia una vez se ha consumido completamente el glicerol. En esta fase se adiciona continuamente un caudal de glicerol decreciente conjuntamente con un caudal fijo de metanol durante las tres horas finales de esta etapa, descrito en el apartado 3.3.3 del capítulo de materiales y métodos. Las representaciones gráficas de los ensayos realizados en este capítulo se harán a partir de la fase de inducción que generalmente se inicia a las 25 h de cultivo y hasta el final de cada proceso.

5.3.1 Producción de ROL en cultivo semicontinuo alimentado con pulsos de metanol (10 g/L - 12h)

Inicialmente se realizó un cultivo en semicontinuo utilizando como estrategia de alimentación únicamente pulsos de metanol a 10 g/L cada 12 h. La idea es reproducir parte de la estrategia recomendada por Invitrogen en cultivos en Erlenmeyer, con adición del sustrato inductor a una concentración determinada cada intervalo de tiempo (Invitrogen, 2012).

En la figura 5.1 se muestra la evolución de la biomasa, el metanol, la actividad lipolítica y los pulsos de metanol a lo largo de la fase de inducción. Se observa que una vez iniciada la fase de adición de pulsos de metanol los niveles de biomasa prácticamente no varían, manteniéndose en un valor alrededor de 29 g/L, debido al poco metanol adicionado. Bajo tales condiciones, era de esperar que no se observara crecimiento significativo.

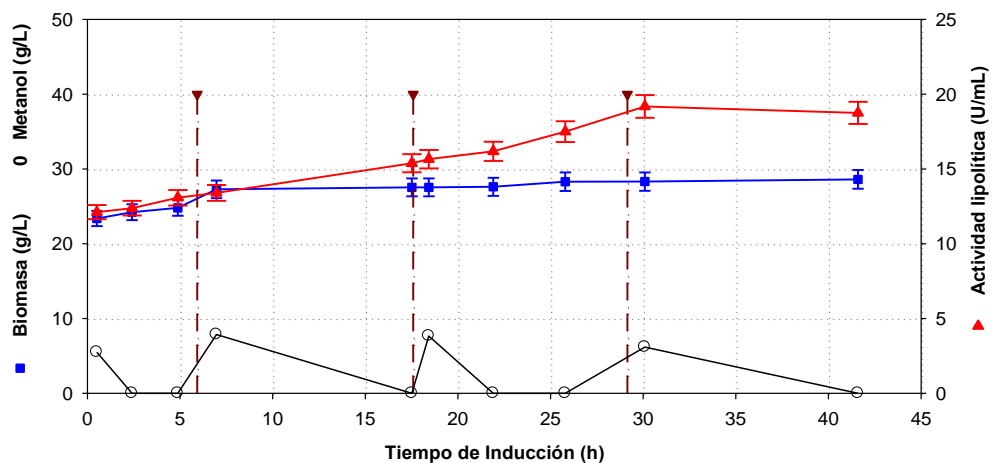


Figura 5.1. Evolución de la biomasa (■), actividad lipolítica (▲), pulsos de metanol (▼) y metanol (○) en la fase de inducción de un cultivo semicontinuo alimentado con pulsos de metanol a una concentración de 10g/L cada 12 h, para la producción de ROL con el fenotipo Mut⁺.

Cuando se analiza la evolución del porcentaje de oxígeno disuelto y la concentración de metanol (Figura 5.2), se puede concluir que la caída del porcentaje de pO₂ está correlacionada con la concentración de metanol en el medio (Kupcsulik y Sevilla, 2004). Se observa que en el primer pulso el metanol adicionado (5 g/L) es consumido rápidamente. Los restantes pulsos de metanol (10 g/L) se consumen, el

primero, en aproximadamente dos horas, incrementándose este tiempo de consumo a medida que avanza el bioproceso, hasta ser, aproximadamente, de 3 horas en la última adición. Por lo que respecta a los niveles de actividad lipolítica éstos se incrementan ligeramente hasta alcanzar 19 U/mL, si bien en la última adición ya no se observa incremento. La producción en la etapa de inducción se incrementa sólo en unas 8 U/mL.

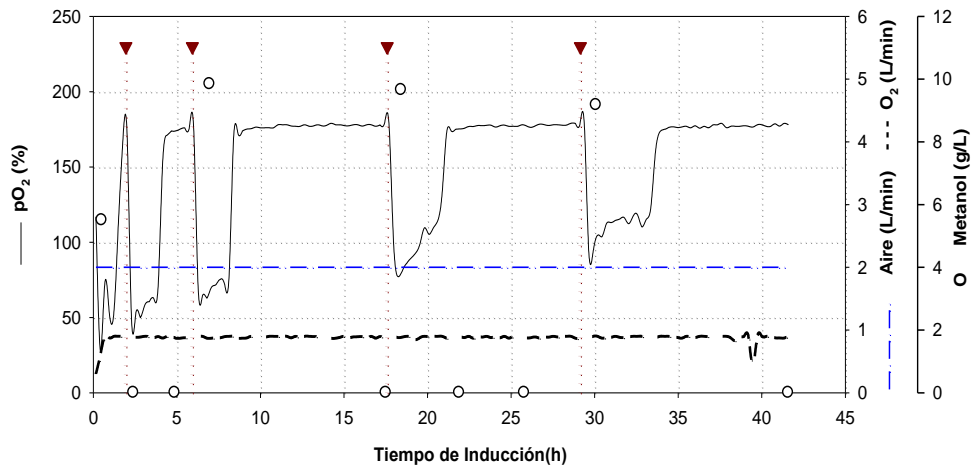


Figura 5.2. Evolución del porcentaje de oxígeno disuelto (—), concentración de metanol (○), caudal de Aire (-.-), caudal de oxígeno (- - -) y pulsos de metanol (▼) durante la fase de inducción en un cultivo semicontinuo con pulsos de metanol a 10g/L cada 12horas, para la producción de ROL con el fenotipo Mut⁺.

Los resultados obtenidos en este experimento muestran que la producción de la proteína recombinante se inicia en las últimas horas de transición, alcanzando una q_p máxima a la hora de iniciada la fase de inducción (100.7 U/g·h). Desafortunadamente, a partir de ese momento disminuye llegando a valores prácticamente despreciables y muy lejos de los valores reportados cuando se utiliza metanol como única fuente de carbono (Barrigón et al., 2013).

Estos resultados nos indican que la estrategia de adición de metanol como único sustrato cada 12 horas mediante pulsos, no es eficaz desde el punto de vista de producción de ROL en cultivos semicontinuos. El permanecer el cultivo tantas horas sin sustrato (aproximadamente el 83% del tiempo de espera entre adiciones) resulta negativo tanto para el crecimiento como para la producción del producto heterólogo. El tiempo de adición entre pulsos se podría fijar alrededor de las 2 horas ligado a la subida brusca del porcentaje de pO₂ indicativo del agotamiento del metanol (figura 5.2).

5.3.2 Producción de ROL en cultivo semicontinuo con sustratos mixtos: alimentación exponencial con glicerol ($\mu=0.1 \text{ h}^{-1}$) y pulsos de metanol a 10 g/L cada 2 h.

En estudios previos utilizando glicerol como sustrato mixto en cepas de fenotipo Mut^s produciendo ROL, se observó que al seleccionar velocidades específicas de crecimiento asociadas al glicerol muy superiores a las de metanol, la producción no sólo era menor sino que se observaba una disminución de la actividad lipolítica al trabajar bajo estas condiciones por efecto de la actividad proteolítica que aparecía en el medio de cultivo (Arnau et al., 2011).

En este apartado se estudia el efecto de fijar una velocidad específica de crecimiento con el fenotipo Mut⁺ de *P. pastoris* para la producción de ROL en cultivo semicontinuo, utilizando un sistema de alimentación con sustratos mixtos (metanol y glicerol). La alimentación con glicerol se efectúa mediante una adición exponencial preprogramada, manteniendo una velocidad específica de crecimiento a 0.1 h^{-1} y se realizan pulsos de metanol a una concentración de 10 g/L cada 2 h. Este tiempo de adición se seleccionó debido a los resultados obtenidos en el ensayo anterior (metanol 10g/L-12h), donde se observó que el tiempo de adición entre pulsos se podría fijar alrededor de las 2 horas. El objetivo es comprobar si al trabajar con el fenotipo Mut⁺, que presenta una mayor velocidad específica de crecimiento sobre metanol que el fenotipo Mut^s, los problemas de baja producción y degradación proteolítica observados al utilizar una velocidad específica de crecimiento fijada de glicerol de 0.1 h^{-1} son minimizados.

Los resultados de variables como biomasa, metanol, glicerol y actividad lipolítica se muestran en la figura 5.3. Se puede observar que al utilizar una μ de 0.1 h^{-1} con glicerol, hay un efecto positivo sobre el crecimiento de la biomasa la cual incrementa progresivamente hasta alcanzar un valor de 68.1 g/L al final del cultivo, a diferencia del experimento anterior donde se utilizaron sólo pulsos de metanol a 10 g/L-12 h.

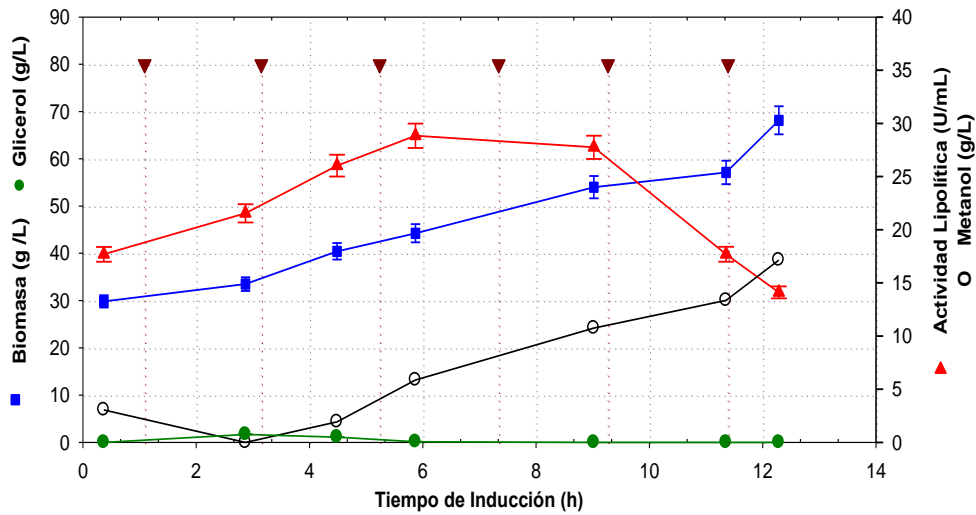


Figura 5.3. Evolución de la biomasa (■), glicerol (●), actividad lipolítica (▲), pulsos de metanol (▼) y concentración de metanol (○); en la fase de inducción de un cultivo semicontinuo alimentado con pulsos de metanol cada 2 h y glicerol a una $\mu=0.1 \text{ h}^{-1}$ para la producción de ROL con el fenotipo Mut⁺

La velocidad específica de crecimiento (figura 5.4) se mantuvo prácticamente constante a partir de las 3 h de inducción, con un valor medio de 0.09 h^{-1} indicando el buen funcionamiento de la estrategia de adición exponencial preprogramada de glicerol, y de la buena elección de los parámetros iniciales. Comparando con el ensayo anterior donde sólo se utilizó pulso de metanol, en este ensayo el uso de sustratos mixtos y menor tiempo en la adición de metanol permitió aumentar el rendimiento biomasa-sustrato en 1.5 veces. La velocidad específica de crecimiento se incrementó en 9 veces (0.01 h^{-1} y 0.09 h^{-1}). Además, es fácil observar que con el uso de sustratos mixtos el crecimiento de la levadura es continuo, a diferencia de los ensayos con pulsos de metanol como único sustrato en que prácticamente no se observaba crecimiento después de iniciada la fase de inducción.

Por lo que respecta a la velocidad específica de consumo de glicerol ésta se mantiene constante a un valor medio de $0.182 \text{ g}_{\text{gil}}/\text{g}\cdot\text{h}$ (figura 5.4). Un valor similar ($0.189 \text{ g}_{\text{gil}}/\text{g}\cdot\text{h}$) se observó en el trabajo realizado por Arnau et al., (2011) utilizando una cepa Mut^s de *P. pastoris* con la misma velocidad específica de crecimiento con glicerol y metanol a una concentración fijada de 2 g/L de metanol.

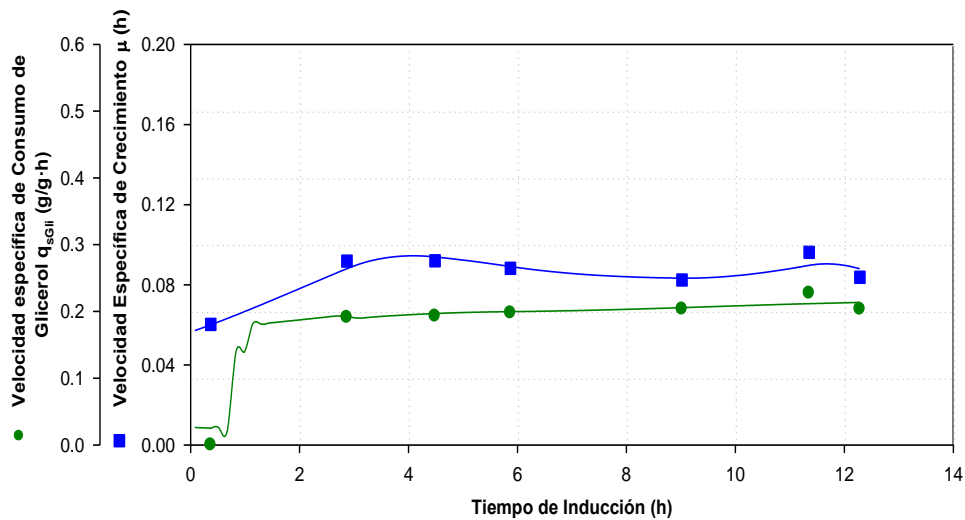


Figura 5.4. Evolución de la velocidad específica de consumo de glicerol $q_{s,gli}$ (●) y la velocidad específica de crecimiento μ (■); durante la etapa de inducción en un cultivo semicontinuo alimentado con pulsos de metanol a 10 g/L cada 2 h y glicerol a una $\mu=0.1 \text{ h}^{-1}$ en la producción de ROL con el fenotipo Mut^+ .

Los resultados del análisis de HPLC de la concentración de los sustratos, muestran que el glicerol se encuentra en condiciones limitantes, bajo estas condiciones el promotor de la P_{AOX} no se encontraría reprimido. No obstante al analizar la evolución de la concentración de metanol se observa una acumulación progresiva después de 5 h de iniciada la fase de inducción, alcanzando un valor de 17 g/L al final del cultivo. Este hecho indica que a partir de este punto el microorganismo es incapaz de consumir en 2 horas los 10 g/L de metanol adicionado en cada pulso, lo que sí había ocurrido durante las dos primeras adiciones.

Si bien se metaboliza una parte del metanol adicionado, haciendo una estimación de la velocidad específica de consumo de metanol a partir de las 5 h de inducción, su valor se situaría alrededor de $0.05 \text{ g}_{met}/\text{g}\cdot\text{h}$. Este valor se encuentra muy lejano al descrito por Cos et al., (2005) para la misma cepa utilizando metanol como única fuente de carbono ($0.14 \text{ g}_{met}/\text{g}\cdot\text{h}$).

No obstante, al comparar este valor al reportado por Arnau et al., (2011) ($0.012 \text{ g}_{met}/\text{g}\cdot\text{h}$), utilizando una cepa con fenotipo Mut^s y glicerol a la misma velocidad específica de crecimiento, el valor en este ensayo es cinco veces superior, debido a que al ser un fenotipo Mut^+ su capacidad de asimilación de metanol es superior a la Mut^s . Sin embargo, este valor es similar al alcanzado con una cepa

Mut^s utilizando glicerol como sustrato mixto a una velocidad específica de crecimiento de 0.02 h⁻¹ donde el promotor de la P_{AOX} no se encontraba reprimido. Por consiguiente, el efecto de represión del glicerol, en sentido figurado, ha convertido una cepa Mut⁺ en una Mut^s, de acuerdo a sus características en función del consumo de metanol.

Cabe destacar que previamente Solà et al., (2007), trabajando con *P. pastoris* reportan concentraciones de metanol residual en cultivos continuos con fuente de carbono mixta. Igualmente, Zalai et al., (2012) describen que las razones de la acumulación de metanol aún no son claras, podría ser ocasionado por efectos de represión debido a un alto flujo de glicerol o por la tasa de alimentación con metanol.

Del análisis de la actividad lipolítica obtenida se observa que ésta es baja, alcanzando un valor máximo de 29 U/mL para luego disminuir progresivamente a medida que se acumula el metanol en el medio de cultivo (figura 5.3). Con esta estrategia de sustratos mixtos se alcanzan resultados de máxima actividad lipolítica 1.5 veces superior que al emplear pulsos de metanol como único sustrato en el experimento anterior si bien la cantidad total de metanol adicionada era mayor. Podemos observar que cuando el glicerol es utilizado bajo las mismas condiciones con una cepa Mut^s a una concentración fija de metanol, la actividad lipolítica máxima alcanzada es 1.9 veces superior a la obtenida en este trabajo, pero igualmente presenta una disminución de unidades de actividad al final del cultivo (Arnau et al., 2011), esta disminución registrada podría ser consecuencia de la acción de proteasas presentes en el medio de cultivo.

Finalmente bajo estas condiciones, se puede concluir que, a pesar de estar el glicerol en condiciones limitantes, el promotor de la P_{AOX} se encuentra parcialmente reprimido y por consiguiente no se pueden programar adiciones de glicerol a velocidades específicas de crecimiento tan altas, con el agravante de la aparición del fenómeno de proteólisis. Algunos autores describen este hecho como un problema significativo en cultivos de *P. pastoris* a altas densidades celulares (Charoenrat et al., 2013).

5.3.3 Producción de ROL en cultivo semicontinuo con sustratos mixtos utilizando pulsos de metanol a diferente frecuencia y alimentación exponencial con glicerol a una velocidad específica de 0.02 h⁻¹.

En el experimento anterior se observó que el consumo de metanol se ve afectado cuando se utiliza una velocidad específica de crecimiento con glicerol de 0.1 h⁻¹; por ello, y de acuerdo a los resultados referenciados por Arnau et al., (2011), se realizaron fermentaciones utilizando una velocidad específica de crecimiento de 0.02 h⁻¹. Esta μ reportó un incremento en la actividad lipolítica utilizando una cepa de *P. pastoris* con fenotipo Mut^s. En un primer bloque de experimentos, el metanol se adicionó a diferente periodo de tiempo y concentración; 10 g/L cada 12 h y 5 g/L cada 6 h.

Como se observa en la figura 5.5 el aumento de la biomasa es progresivo durante todo el cultivo, obteniéndose una biomasa final de 53.7 g/L cuando la concentración de metanol era de 10 g/L cada 12 h, y de 50.4 g/L cuando el metanol era de 5 g/L cada 6 h. la velocidad específica de crecimiento media fue de 0.019 h⁻¹ en el primer caso y de 0.022 h⁻¹ en el segundo caso. En ambos cultivos el glicerol permaneció limitante durante todo el cultivo. El comportamiento de la cepa con respecto al crecimiento celular fue similar en los cultivos realizados.

Con respecto a la evolución de los niveles de lipasa extracelular, se observó que la concentración y el tiempo de los pulsos de metanol afectan la producción de la proteína heteróloga (Figura 5.5). La actividad neta obtenida en la inducción es similar en los dos cultivos (25 U/mL). En ambos casos se observa una producción significativa en las primeras fases de la inducción que va disminuyendo progresivamente. Esta disminución es más drástica para los pulsos de mayor concentración de metanol (Figura 5.5 A), a partir de las 25 horas no se observa producción. En contrapartida con pulsos de concentración de metanol menor la producción de ROL, si bien disminuye su velocidad a lo largo del cultivo, no se detiene. Por consiguiente, parece que la concentración de los pulsos de metanol y su frecuencia tienen una influencia significativa en la producción del producto heterólogo.

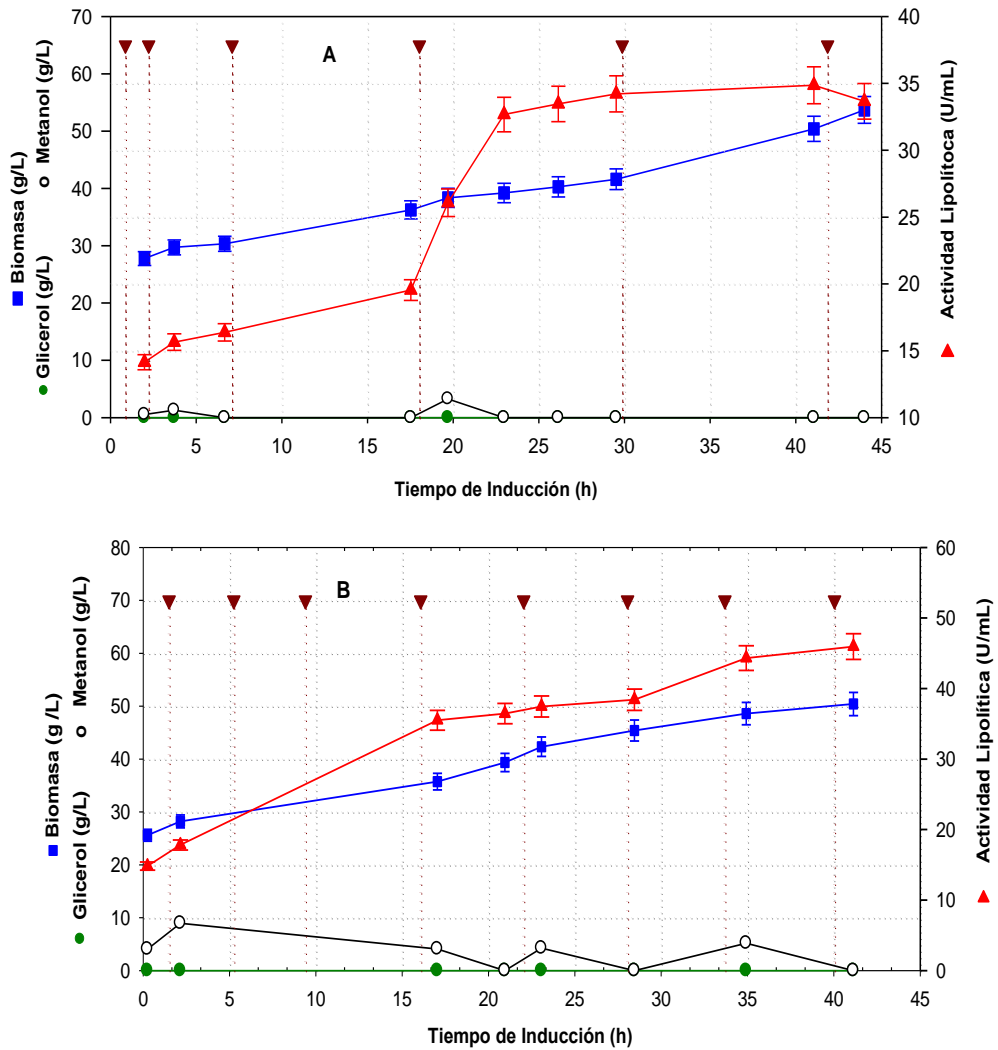


Figura 5.5. Evolución de los diferentes parámetros en la fase de inducción en cultivos semicontinuos con alimentación exponencial de glicerol a una $\mu = 0.02\text{h}^{-1}$ y pulsos de metanol 10g/L-12h (A) / 5g/L-6h (B).

Con estos resultados se proyectó un nuevo experimento en que los pulsos de metanol fueron de 5 g/L cada hora, a la misma velocidad específica de crecimiento sobre glicerol de 0.02 h^{-1} .

En el ensayo de 5 g/L cada hora (figura 5.6), la biomasa final obtenida es de 54.1 g/L. En este cultivo se puede ver una tendencia similar a la observada en los cultivos anteriores de pulsos con frecuencia menor, de 5 y 10 g/L de metanol. No se observa la acumulación de sustratos siendo limitantes durante todo el cultivo. La velocidad específica de crecimiento media fue de 0.028 h^{-1} . Este valor más alto es debido a

que al disponer de una mayor concentración de metanol, su aportación al crecimiento es importante, a diferencia de los otros experimentos. Hay que tener en cuenta que la $\mu_{\text{máx}}$ creciendo sobre metanol produciendo ROL es de 0.06 h^{-1} (Cos et al., 2006). Haciendo referencia a la actividad lipolítica, se puede ver una evolución creciente durante el cultivo, presentando un valor máximo de 47 U/mL (figura 5.6). Se observa que al trabajar con una μ de 0.02 h^{-1} el valor de la actividad lipolítica registrada es 1.6 veces superior a la obtenida cuando se trabaja a una μ de 0.1 h^{-1} .

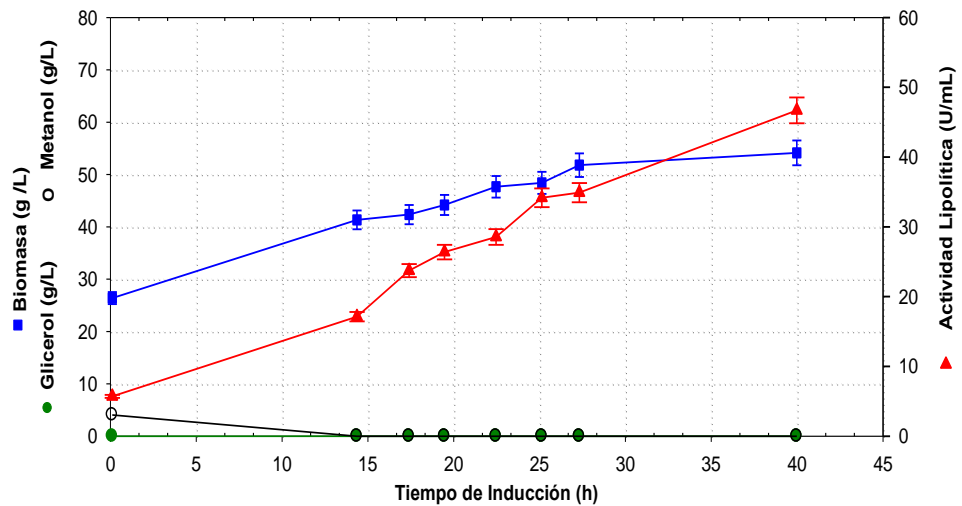


Figura 5.6. Evolución de la biomasa (■), glicerol (●), actividad lipolítica (▲) y concentración de metanol (○); en la fase de inducción de un cultivo semicontinuo alimentado con pulsos de metanol cada hora y glicerol a una $\mu=0.02 \text{ h}^{-1}$ para la producción de ROL con el fenotipo Mut*

5.3.4 Comparación de los resultados utilizando la estrategia de alimentación con pulsos de metanol a diferentes concentraciones y frecuencia, alimentando glicerol como cosustrato a una velocidad de crecimiento de 0.02 h^{-1} .

Una vez se ha observado el comportamiento de las fermentaciones para cada una de las condiciones probadas, en este apartado se realiza una comparación entre todos los cultivos realizados a una μ de 0.02 h^{-1} . En la figura 5.7 se presenta la comparación de la evolución de la biomasa para las tres adiciones de pulsos de metanol. El comportamiento de esta variable fue muy similar en los cultivos debido a la baja concentración de metanol adicionado con respecto al glicerol. No obstante, el cultivo en el cual se adiciona metanol cada hora alcanza una concentración de

biomasa algo superior. En cambio, los tiempos de adición de los pulsos de metanol al medio tienen poco efecto sobre el crecimiento de la biomasa. La μ_{media} para el experimento de 5 g/L cada hora es 1.4 veces más alta que para los otros ensayos (Tabla 5.1) que se encuentran en el entorno de la consigna fijada por el glicerol (0.02 h^{-1}). Este es un resultado similar al observado por Arnau et al., (2011) trabajando con una cepa Mut^s a una concentración constante de metanol de 2 g/L y glicerol a 0.02 h^{-1} , lo que indica que desde el punto de vista de consumo de glicerol no existen diferencias en función del fenotipo de *Pichia* que se utilice.

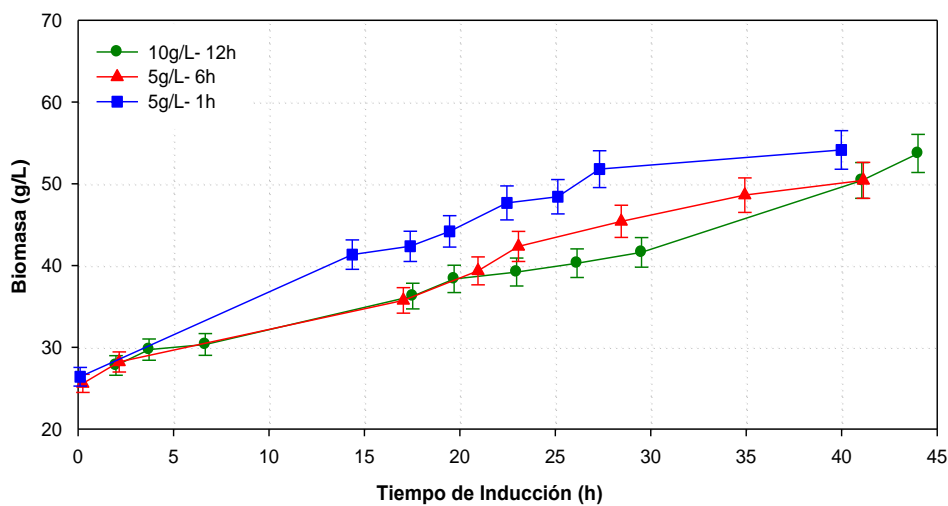


Figura 5.7. Evolución de la biomasa a lo largo de la fase de inducción en cultivos semicontinuos con alimentación exponencial de glicerol a una $\mu = 0.02 \text{ h}^{-1}$ y pulsos de metanol. ● 10 g/L de metanol cada 12 horas; ▲ 5 g/L de metanol cada 6 horas; ■ 5 g/L de metanol cada hora.

En la figura 5.8 se presenta la evolución de la velocidad específica de consumo de glicerol para las tres estrategias realizadas. El comportamiento muy parecido en los tres casos. Únicamente apuntar que la estrategia con pulsos de adición de 5 g/l de metanol cada hora el valor es ligeramente inferior. Si bien podría interpretarse que la mayor presencia de metanol afecta negativamente a la velocidad de consumo de glicerol, el hecho de que no se acumule parece no soportar esta teoría. Puede que el error venga motivado por una no correcta sintonía de los parámetros iniciales de la ecuación de adición exponencial preprogramada, y más concretamente de una posible discrepancia en la estimación de la biomasa, el volumen inicial o la concentración de glicerol en el alimento. Si se comparan los valores de q_s presentados en la tabla 5.1 se observan que los valores son del orden de $0.041 \text{ g}_{gli}/\text{g}\cdot\text{h}$. Similares a los obtenidos con el fenotipo Mut^s utilizando la misma

consigna de 0.02 h^{-1} ($0.037 \text{ g}_{\text{glic}}/\text{g}\cdot\text{h}$) y controlando el *set-point* de metanol a 2 g/L (Arnau et al., 2011). Este nos confirma que las diferentes estrategias de adición de metanol no afectan a la velocidad específica de consumo de glicerol independientemente del fenotipo seleccionado.

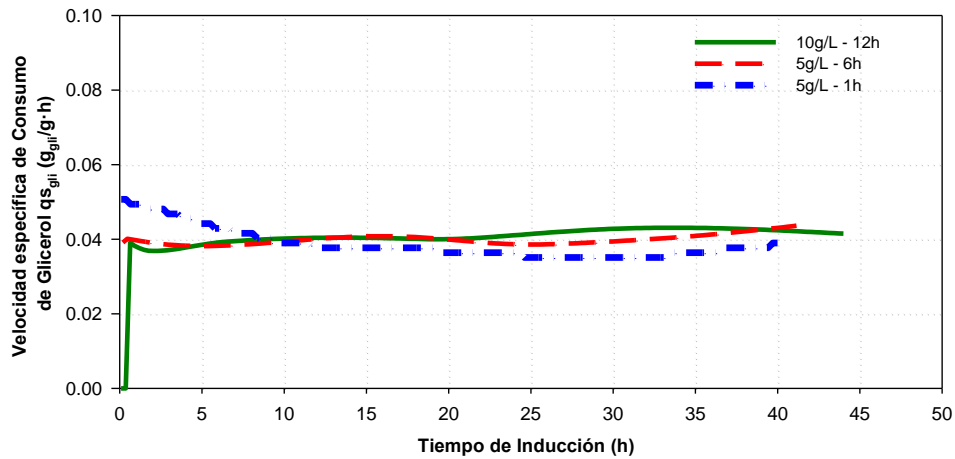


Figura 5.8. Evolución de la velocidad específica de consumo de glicerol en la fase de inducción de un cultivo semicontinuo utilizando sustratos mixtos a diferentes pulsos de metanol y velocidad específica de crecimiento sobre glicerol de 0.02 h^{-1} .

Finalmente en la figura 5.9 se observa el perfil de la actividad lipolítica para los cultivos realizados en las diferentes estrategias. Se observa que la concentración de los pulsos de metanol y el tiempo de adición afectan la producción de la proteína heteróloga. Es importante destacar que los niveles de actividad que se obtienen al final de la fase de transición no son similares. Esto indica que, aunque hasta esta fase la metodología es la misma para las tres fermentaciones, los niveles de actividad no son reproducibles. La regulación manual del caudal de aire a adionar puede ser la causa de que aparezcan subproductos que puedan afectar a los niveles de producción. En otras fermentaciones del grupo se ha detectado la presencia de arabitol y ácido acético, ello puede motivar los diferentes niveles alcanzados.

Por otra parte, después de las primeras horas de inducción en que los niveles de actividad se mantienen relativamente sin variación, se observa que las dos estrategias en las que la adición de metanol se realiza más espaciadas en el tiempo a partir de las 25 horas de inducción o bien se para la producción (pulsos cada 12 horas), o bien se ralentiza la misma (pulsos cada 6 horas). Sólo en el caso de la

adición de metanol cada hora se observa un aumento de la producción con el tiempo. Por consiguiente parece claro que dejar demasiado tiempo entre adiciones de metanol es una mala estrategia.

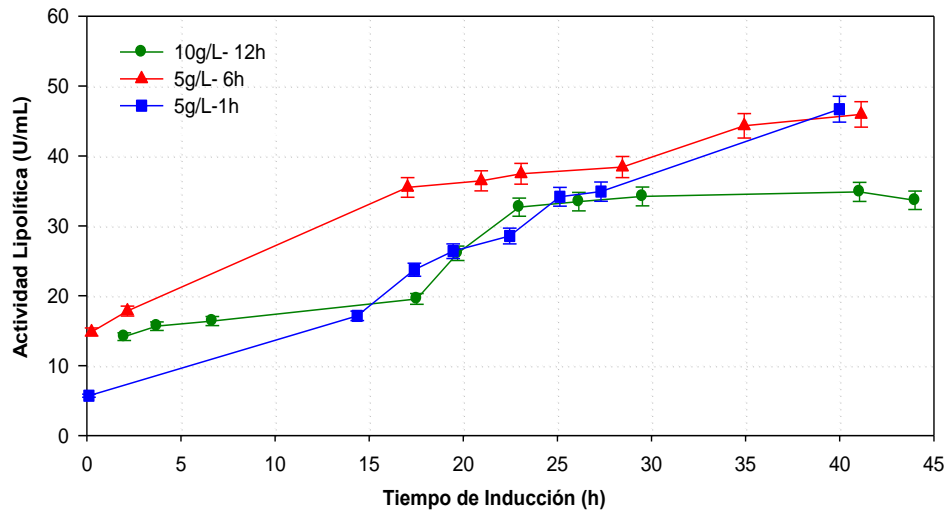


Figura 5.9. Evolución de la actividad lipolítica en la fase de inducción de un cultivo semicontinuo utilizando sustratos mixtos a diferentes pulsos de metanol y velocidad específica de crecimiento de 0.02 h^{-1} .

Más información proporcionan algunos parámetros presentados en la tabla 5.1. Si bien la producción absoluta es por muy poco mayor en la estrategia de mayor frecuencia de adición de metanol, hay que advertir que en la tabla los cálculos están realizados a punto final excepto para la μ de 0.1 h^{-1} que se han calculado en el máximo. Por consiguiente, no se tiene en cuenta la actividad producida sólo en la etapa de inducción ya que si se hiciera el cálculo en esta etapa claramente la estrategia de mayor frecuencia de adición de metanol sería la óptima. Es interesante destacar que el $Y_{p/X}$ es similar en las tres estrategias a una μ de 0.02 h^{-1} entre 850 y 915 (U/g). No obstante, si se hace referencia a la productividad específica respecto metanol, claramente se observa que la mejor opción no se encuentra asociada a la mayor cantidad de metanol adicionado. La productividad específica es muy similar en las tres estrategias y la volumétrica sólo es inferior en la estrategia de menor frecuencia de adición de metanol.

Sin embargo, los valores de la máxima actividad lipolítica, $Y_{P/X}$, y productividades volumétricas y específicas se encuentran muy por debajo de las obtenidas con el fenotipo Mut^s a las mismas condiciones de adición de glicerol pero

manteniendo la consigna de metanol a 2 g/l (Arnau et al., 2011) y con el fenotipo Mut⁺ utilizando metanol como única fuente de carbono a una consigna de 2 g/l (Barrigón et al., 2013). Por consiguiente, el sistema simple de adición de pulsos de metanol y alimentación de glicerol mediante una exponencial preprogramada utilizado en este capítulo, si bien es muy simple, no se acerca a los valores obtenidos en las estrategias anteriormente citadas.

Tabla 5.1. Parámetros de Productividad y velocidades específicas de los cultivos a diferentes pulsos de metanol

Pulsos de Metanol	Met 10g/L -- 2h	Met 10g/L -- 12h	Met 5g/L-- 6h	Met 5g/L -- 1h
μ de Glicerol (h⁻¹)	0.10	0.02	0.02	0.02
Actividad lipolítica máxima (U/mL)	29	34	46	47
Y _{P/X} (U/g)	665	846	913	869
Productividad Volumétrica (U/L·h)	948	486	678	663
Productividad Específica (U/g·h)	21.4	12.7	13.4	12.3
Productividad Específica de Metanol (U/g _{met} ·h)	30.1	11.3	13.3	4.50
μ _{media} (h ⁻¹)	0.090	0.019	0.022	0.028
q _{s,media} (g _{gli} /g·h)	0.182	0.041	0.041	0.037

5.3.5 Pureza de la proteína recombinante obtenida durante los ensayos de alimentación con pulsos de metanol

En muchos procesos productivos el costo de la recuperación y posterior purificación del producto de interés definen la viabilidad del proceso. En este sentido se dedican muchos esfuerzos para desarrollar procesos de recuperación efectivos ya que el costo de esta etapa puede constituir un amplio porcentaje del costo total del proceso.

Es probable que el crecimiento celular sobre metanol como única fuente de carbono para la producción de proteínas recombinantes cause estrés sobre la maquinaria celular, lo cual provoca mayor actividad de las proteasas. La degradación de proteínas recombinantes secretadas podría ser una acción combinada de la sobreproducción de proteasas lo cual resulta en rompimiento de la membrana (Sinha et al., 2005).

Se determinó la pureza del producto obtenido en términos de actividad con respecto a la proteína total a lo largo del cultivo (Figura 5.10), Los mayores índices de actividad específica (35 U/mg proteína total) se observaron para las muestras obtenidas utilizando pulsos de metanol a una concentración de 5 g/L cada hora, siendo el producto final 2.3 veces más puro que los otros ensayos.

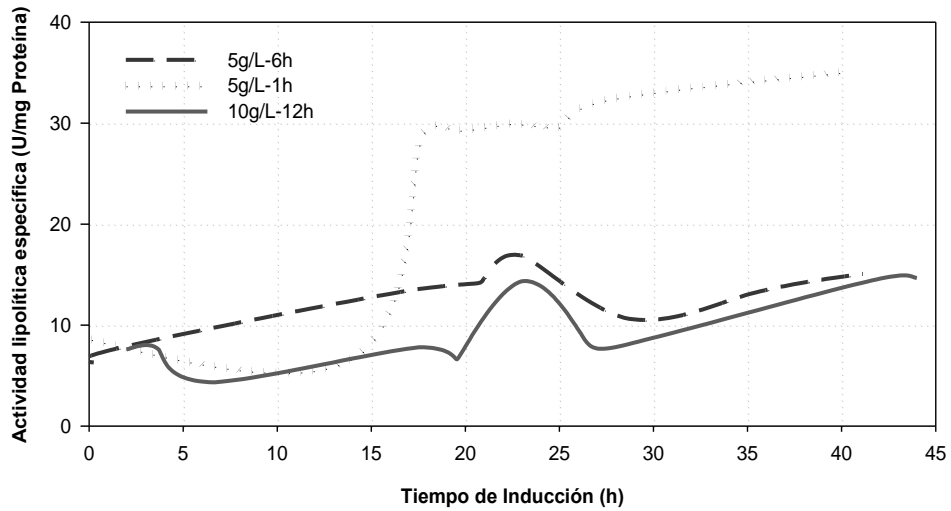


Figura 5.10 Actividad lipolítica específica en la fase de inducción en cultivos semicontinuos con alimentación exponencial de glicerol a una $\mu=0.02 \text{ h}^{-1}$ y pulsos de metanol.

Este resultado es muy interesante ya que en la mayoría de los bioprocesos el éxito económico del mismo depende de la simplicidad y grado de pureza del producto, desde esta óptica la mínima discontinuidad en la adición del metanol afecta positivamente ya que la proteína total secretada es menor y por consiguiente la actividad lipolítica específica mayor (3 veces).

5.4 Conclusiones

En este capítulo se ha estudiado el efecto de pulsos de metanol en la producción de ROL en cultivo en semicontinuo, alimentado con glicerol como cosustrato a velocidades específicas de crecimiento de 0.1 y 0.02 h⁻¹, obteniéndose las siguientes conclusiones:

Al trabajar con una alimentación con pulsos de metanol como única fuente de carbono, hay una clara disminución de la producción de la proteína heteróloga como consecuencia de la escasez de fuente de carbono por un tiempo prolongado.

La estrategia aplicada a un cultivo semicontinuo con una μ de glicerol de 0.1 h⁻¹, permite incrementar la biomasa, pero hay una clara represión del promotor P_{AOX} , afectando directamente la actividad lipolítica extracelular y la velocidad específica de producción. Además se observa la aparición de actividad proteolítica de manera similar a lo que ocurre a la misma μ para el fenotipo Mut^s.

La concentración de metanol utilizada y el tiempo entre los pulsos de metanol afectan a los niveles de proteína producidos. En términos de actividad lipolítica máxima y $Y_{P/X}$ los mejores resultados corresponden a la utilización de periodos de adición menores, de 6 horas y 1 hora con pulsos de metanol de 5 g/L. Sin embargo la mayor productividad volumétrica y específica tanto referida a biomasa como a metanol es la obtenida al adicionar este sustrato cada hora.

La estrategia de utilizar sustratos mixtos en semicontinuo para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* con una aplicación de pulsos de metanol, si bien es una estrategia operacional mucho más simple, no se ha acercado a la productividad del bioproceso obtenida cuando se controla la concentración de metanol en el medio.

5.5 Bibliografía

- Arnau, C., Ramon, R., Casas, C., y Valero, F. (2010). Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(6), 494–500.
- Arnau, C., Casas, C., y Valero, F. (2011). The effect of glycerol mixed substrate on the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system. *Biochemical Engineering Journal*, 57, 30–37.
- Barrigón, J. M., Montesinos, J. L., y Valero, F. (2013). Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut⁺ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures?. *Biochemical Engineering Journal*, 75, 47–54.
- Charoenrat, T., Khumruaengsri, N., Promdonkoy, P., Rattanaphan, N., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S., y Roongsawang, N. (2013). Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(2), 193–8.
- Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J. L., Ferrer, P., Cregg, J. M., y Valero, F. (2005). Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 116, 321–335.
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., y Valero, F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microbial Cell Factories*, 5, 17.
- D'Anjou, M. C., y Daugulis, A. J. (2000). Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. *Biotechnology Letters*, 22, 341–346.
- Files, D., Ogawa, M., Scaman, C. H., y Baldwin, S. A. (2001). A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme and Microbial Technology* 29, 29, 335–340.
- Invitrogen. (2012). *Pichia Expression Kit: For expression of recombinant proteins in Pichia pastoris*.
- Jungo, C., Marison, I., y von Stockar, U. (2007). Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *Journal of Biotechnology*, 128(4), 824–37.
- Kupcsulik, B., y Sevela, B. (2004). Effect of methanol concentration on the recombinant *Pichia pastoris* Mut^s fermentation. *Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.*, 48(2), 73–87.
- Loewen, M. C., Liu, X., Davies, P. L., y Daugulis, A. J. (1997). Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(4), 480–6.

- Ramón, R., Ferrer, P., y Valero, F. (2007). Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 130(1), 39–46. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.02.025
- Sagmeister, P., Kment, M., Wechselberger, P., Meitz, A., Langemann, T., y Herwig, C. (2013). Soft-sensor assisted dynamic investigation of mixed feed bioprocesses. *Process Biochemistry*, 48(12), 1839–1847.
- Sinha, J., Plantz, B. A., Inan, M., y Meagher, M. M. (2005). Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon- τ . *Biotechnology and Bioengineering*, 89(1), 102–12. doi:10.1002/bit.20318
- Solà, A., Jouhten, P., Maaheimo, H., Sánchez-Ferrando, F., Szyperski, T., y Ferrer, P. (2007). Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol/methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 1), 281–90.
- Surribas, A., Stahn, R., Montesinos, J. L., Enfors, S. O., Valero, F., y Jahic, M. (2007). Production of a *Rhizopus oryzae* lipase from *Pichia pastoris* using alternative operational strategies. *Journal of Biotechnology*, 130(3), 291–9.
- Valero, F. (2013). Bioprocess engineering of *Pichia pastoris*, an exciting host eukaryotic cell expression system. In *Protein Engineering - Technology and Application* (pp. 3–32).
- Zalai, D., Dietzsch, C., Herwig, C., y Spadiut, O. (2012). A dynamic fed batch strategy for a *Pichia pastoris* mixed feed system to increase process understanding. *Biotechnology Progress*, 28(3), 878–86.
- Zhang, W., Sinha, J., Smith, L. A., Inan, M., y Meagher, M. M. (2005). Maximization of production of secreted recombinant proteins in *Pichia pastoris* fed-batch fermentation. *Biotechnology Progress*, 21(2), 386–93.

Capítulo 6

Producción de ROL recombinante en cultivo semicontinuo utilizando como estrategia de alimentación mixta una adición exponencial preprogramada de glicerol (control en lazo abierto) y control en línea de metanol.

Contenido

Producción de ROL recombinante en cultivo semicontinuo utilizando como estrategia de alimentación mixta una adición exponencial preprogramada de glicerol (control en lazo abierto) y control en línea de metanol.	115
6.1 Resumen	117
6.2 Introducción.....	119
6.3 Resultados y Discusión	123
6.3.1 Producción de ROL en cultivo semicontinuo, alimentado con glicerol a una μ de 0.02 h^{-1} y metanol a 2 g/L	124
6.3.2 Evaluación de la pureza del producto cuando se utiliza la estrategia de alimentación con sustratos mixtos con control en línea con metanol y alimentación exponencial con glicerol.	127
6.4 Conclusiones.....	131
6.5 Bibliografía	133

Estudio de la producción de ROL en cultivo semicontinuo utilizando como estrategia de alimentación mixta una adición exponencial pre programada de glicerol (control en lazo abierto) y control en línea de metanol.

6.1 Resumen

Se han diseñado estrategias de adición de sustratos mixtos, utilizando metanol como sustrato inductor y otra fuente de carbono, preferentemente glicerol como cosustrato en condiciones limitantes, de manera que no se reprima el promotor $P_{A_{OX1}}$. Esta estrategia aporta diversos beneficios operacionales como una disminución del consumo de oxígeno, reducción del tiempo de inducción y una baja generación de calor, comparados con la utilización de metanol como única fuente de carbono.

La estrategia con sustratos mixtos se ha utilizado mayoritariamente para el fenotipo Mut^s , debido a su capacidad limitada de asimilar el metanol, lo cual ha dado como resultado largas fases de inducción (mínimo 100 h). Se ha observado que al utilizar glicerol-metanol, a medida que se incrementa el consumo de glicerol, disminuye el consumo de metanol lo que se refleja en una disminución en la productividad del bioproceso. Este trabajo se plantea valorar la capacidad del glicerol actuando como cosustrato con el metanol en la producción de ROL utilizando el fenotipo Mut^+ de *P. pastoris*, analizando la influencia de la μ mediante diferentes perfiles de alimentación exponencial de glicerol manteniendo la consigna de metanol constante.

Se realizaron fermentaciones en semicontinuo con sustratos mixtos utilizando una concentración de metanol fija (1.5 y 2 g/L) y glicerol como cosustrato mediante una adición exponencial preprogramada (0.02 y 0.05 h^{-1}) con objeto de mantener constante la velocidad específica de crecimiento sobre este cosustrato en una cepa de *P. pastoris* de fenotipo Mut^+ . En el ensayo realizado utilizando una μ de glicerol a 0.02 h^{-1} y una concentración de metanol a 2 g/L. Se alcanza un valor máximo de 74.6 U/mL al final de la fase de inducción. Desde el punto de vista de actividad final la estrategia utilizada no mejora ninguna de las dos previamente implementadas tanto con Mut^s con sustratos mixtos como con Mut^+ utilizando metanol como única

fuentes de carbono. Probablemente la presencia de glicerol, a pesar de ser limitante, disminuye la capacidad del promotor P_{AOX1} y como consecuencia la actividad final.

La estrategia utilizando glicerol como cosustrato específicamente para el fenotipo Mut⁺ no mejora los resultados obtenidos utilizando metanol como única fuente de carbono, donde los valores son del orden del 50% superiores a los obtenidos en este trabajo, siendo mucho más bajos cuando se comparan con los obtenidos en el fenotipo Mut^s, demostrándose que para estas condiciones en la producción de ROL con *P. pastoris* el comportamiento de sustratos mixtos (glicerol-metanol) en el fenotipo Mut⁺ no representa una buena alternativa en la mejora de la productividad del bioproceso.

6.2 Introducción

La fermentación en semicontinuo, donde sustratos, nutrientes y/o inductores son alimentados en el fermentador de forma intermitente o continua, es la estrategia predominante de operación en bioprocesos de producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, ya que minimiza los efectos nocivos tales como la inhibición por sustrato y la represión catabólica. Además permite controlar la velocidad específica de crecimiento de las células y alcanzar altas densidades celulares al igual que altas concentraciones de producto (D'Anjou y Daugulis, 2000).

Se han investigado diferentes estrategias para la alimentación en fermentaciones en semicontinuo con la finalidad de encontrar un esquema eficiente para la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. El uso de metanol como única fuente de carbono es la estrategia de alimentación más utilizada, debido a que produce un alto rendimiento de la proteína heteróloga. Un gran inconveniente de este proceso es la baja velocidad de crecimiento y producción celular sobre este sustrato que limita la productividad del bioproceso. En paralelo, el crecimiento sobre sustratos como glicerol o glucosa permite altas velocidades de crecimiento celular, pero la expresión de los genes foráneos no es inducida de manera eficiente debido a que son represores del promotor P_{AOX1} (Thorpe et al., 1999). No obstante, se han diseñado estrategias de adición de sustratos mixtos, utilizando metanol como sustrato inductor y otra fuente de carbono, preferentemente glicerol como cosustrato en condiciones limitantes, de manera que no se reprima el promotor P_{AOX1} .

La estrategia de alimentación mixta aporta diversos beneficios operacionales, como una disminución del consumo de oxígeno, reducción del tiempo de inducción y una baja generación de calor, comparados con la utilización de metanol como única fuente de carbono. Además facilita el incremento de la biomasa a partir del segundo sustrato, por lo tanto, se suele obtener un aumento de la productividad volumétrica y una reducción en el tiempo de inducción. (Potvin, et al., 2012; Zalai, et al., 2012).

Para integrar y combinar el crecimiento y la inducción de la expresión de la proteína heteróloga en un proceso fermentativo, se han investigado diferentes estrategias de alimentación mixta para la producción de la proteína heteróloga. Particularmente se han observado incrementos en la productividad de la proteína recombinante utilizando alimentos mixtos como; glicerol-metanol (Cregg et al., 1993;

Katakura et al., 1998; Zhang et al., 2003; Jungo et al., 2007a) o sorbitol-metanol (Thorpe et al., 1999; Xie et al., 2005; Jungo et al., 2007b; Arnau et al., 2010). La optimización de la mayoría de estas estrategias se ha basado en la selección de una relación óptima de los dos sustratos mediante una alimentación conjunta.

La estrategia con sustratos mixtos se ha utilizado mayoritariamente para el fenotipo Mut^s, debido a su capacidad limitada de asimilar el metanol, lo cual ha dado como resultado largas fases de inducción (mínimo 100 h). Utilizando este fenotipo Files, et al., (2001), evaluaron diferentes efectos de la velocidad de adición de glicerol manteniendo constante la velocidad de adición de metanol para la producción de cistatina C humana; Estos autores observaron que la máxima producción de la proteína recombinante disminuye al aumentar la velocidad de adición de glicerol, alcanzándose el óptimo cuando la velocidad de adición del glicerol corresponde a 2 g_{gli}/h.L. Xie et al., (2003), desarrollaron un control en línea del metanol y realizaron variaciones del caudal de adición de glicerol para la producción de angiostatina; la concentración de metanol se mantiene fija a 5 g/L y el glicerol se adiciona al 50% (p/p) variando el caudal con la finalidad de mantener una adición exponencial, los niveles máximos de producción se alcanzaron cuando la relación de consumo es de 1.5:1 g_{gli}/g_{met}, indicando en este caso que el metanol presenta una contribución tanto para la generación de biomasa como para la expresión de la angiostatina.

Cabe remarcar que la estrategia de sustratos mixtos se ha utilizado también con el fenotipo Mut⁺, ya que la presencia de un cosustrato permitiría ventajas operacionales. El fenotipo Mut⁺ ha sido utilizado por McGrew et al., (1997), quienes emplearon alimentos mixtos de glicerol-metanol en una relación 1:1 g_{gli}/g_{met} mejorando significativamente la viabilidad del cultivo celular y la densidad celular, así como los niveles de expresión del ligando CD40 al compararlo con la alimentación solamente con metanol. Choi y Park., (2006), estudiaron el efecto de la combinación de diferentes relaciones de glicerol-metanol con una adición continua en la producción de una α -amilasa de ratón con el fenotipo Mut⁺ de *P. pastoris*, utilizando diferentes relaciones en la mezcla de los sustratos, encontrando como óptima la relación correspondiente a 1:0.5 g_{met}/g_{gli}. Jungo et al., (2007a) utilizando sustratos mixtos glicerol-metanol logran optimizar la producción de avidina con el fenotipo Mut⁺, encontrando que la mejor estrategia es utilizando una μ de 0.06 h⁻¹ a una adición exponencial preprogramada. Otros autores investigaron la influencia de una

alimentación desacoplada de los sustratos, basado en un ajuste individual de las velocidades específicas de consumo para cada sustrato; resultando ser una herramienta valiosa tanto para la comprensión del proceso como para la optimización en la formación del producto en *P. pastoris* en un entorno con sustratos mixtos (Zalai et al., 2012).

En el Grupo de Investigación en Bioprocesos del Departamento de Ingeniería Química de la UAB, la producción de lipasa de *Rhizopus oryzae* bajo el promotor P_{AOX1} ha sido ampliamente estudiada. Para la optimización del bioproceso, reduciendo los cuellos de botella del mismo, se han estudiado aspectos fisiológicos, operacionales y de monitorización y control del bioproceso.

Cos et al., (2006a), realizaron experimentos para demostrar la importancia de mantener una determinada concentración de metanol en el cultivo para poder incrementar la productividad del proceso, comprobando que la concentración de sustrato es uno de los parámetros clave en la producción de ROL empleando *P. pastoris* bajo el promotor P_{AOX1} en una cepa Mut^s.

Ramón et al., (2007), realizaron un primer ensayo utilizando el sorbitol como un cosustrato para la producción de lipasa de *Rhizopus oryzae* con el fenotipo Mut^s, obteniendo productividades más elevadas que las alcanzadas cuando se utiliza metanol como única fuente de carbono. Posteriormente, Arnau et al., (2010) aplicando la estrategia de sustratos mixtos (sorbitol-metanol) con este mismo fenotipo, encontraron que uno de los parámetros claves, en términos de producción de proteínas heterólogas, es la concentración de metanol seleccionada. Para este caso fue de 2 g/L, al utilizar una concentración más baja o más alta disminuye la velocidad de producción específica. En contraposición a estos resultados, cuando se realizó una mezcla glicerol-metanol con el fenotipo Mut^s (Arnau et al., 2011), se obtiene un rendimiento más bajo en términos de productividad específica y rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$), pero la productividad y la actividad lipolítica alcanzada son muy similares a las obtenidas cuando se utiliza sorbitol-metanol bajo las mismas condiciones. También se observó que al utilizar glicerol-metanol, a medida que se incrementa el consumo de glicerol, disminuye el consumo de metanol lo que se refleja en una disminución en la productividad del bioproceso.

Con estos antecedentes, este trabajo se plantea valorar la capacidad del glicerol actuando como cosustrato con el metanol en la producción de ROL utilizando el fenotipo Mut⁺ de *P. pastoris*, analizando la influencia de la μ mediante diferentes perfiles de alimentación exponencial de glicerol manteniendo la consigna de metanol constante.

6.3 Resultados y Discusión

Con la finalidad de evaluar el efecto sobre la productividad y la producción de ROL se llevaron a cabo fermentaciones en semicontinuo con sustratos mixtos utilizando una concentración de metanol fija y glicerol como cosustrato mediante una adición exponencial preprogramada con objeto de mantener constante la velocidad específica de crecimiento sobre este cosustrato, y siempre en condiciones limitantes, Los cultivos en semicontinuo se realizaron siguiendo la metodología descrita en el *apartado 3.3*, utilizando un sistema de control de metanol (*apartado 3.3.4*) con dos consignas de metanol (1.5 y 2 g/L) y dos velocidades específica de crecimiento con glicerol (0.02 y 0.05 h⁻¹) en una cepa de *P. pastoris* de fenotipo Mut⁺.

Todos los cultivos tienen una fase discontinua de consumo de glicerol y una posterior fase de transición, común para todos los experimentos realizados. La fase de inducción se inicia mediante la estrategia de adición exponencial preprogramada (control en lazo abierto) de glicerol para mantener una velocidad específica de crecimiento constante sobre este sustrato. Los cálculos del caudal inicial de glicerol se realizaron utilizando la *fórmula 3.1* descrita en el *apartado 3.3.4*. Los valores que se utilizan para calcular el caudal inicial son: $V_o=2.1\text{L}$; $Y_{x/s}=0.5\text{ g/g}_{\text{gli}}$; $X_o=19\text{ g/L}$; $S_o=550\text{ g/L}$. Se fijó un caudal de aire de 4 L/min en la etapa discontinua y una mezcla en proporción variable de aire-oxígeno que no supera los 5 L/min de caudal total en la fase de inducción.

El metanol se mantiene en la consigna deseada mediante la medida en línea proporcionada por un detector de metanol y unidad de sensor (Raven Biotech Inc., Vancouver, Canadá), utilizando un algoritmo de control predictivo combinado con un controlador PI descrito previamente por Cos et al., (2006b). En todos los cultivos se observó una buena respuesta del controlador y la capacidad del mismo para mantener la concentración de metanol deseada en cada ensayo realizado. Las representaciones gráficas se muestran a partir de la fase de inducción de los cultivos realizados, que generalmente es a partir de las 25 h del inicio del cultivo.

6.3.1 Producción de ROL en cultivo semicontinuo, alimentado con glicerol a una μ de 0.02 h^{-1} y metanol a 2 g/L

Los resultados previos obtenidos en el capítulo 5 de esta tesis, donde el glicerol se utiliza como cosustrato, demostraron que utilizar altas μ de glicerol provoca una clara represión del promotor P_{AOX1} , lo cual afecta la productividad del bioproceso. Por ello, se planteó un ensayo con una μ de glicerol a $0,02 \text{ h}^{-1}$ y una concentración de metanol a 2 g/L , condiciones descritas por Arnau et al., (2011), como favorables para el crecimiento y la producción de ROL en una cepa de *P. pastoris* fenotipo Mut^s. Por consiguiente, con la finalidad de incrementar la biomasa y mejorar la productividad, se llevó a cabo una fermentación en semicontinuo a las condiciones óptimas obtenidas con el fenotipo Mut^s.

En la figura 6.1 se muestra la evolución de algunos parámetros importantes del bioproceso utilizando esta estrategia de cultivo. La duración del cultivo fue de 68.2 h , con un tiempo de inducción de 42.9 h . La biomasa incrementa progresivamente hasta alcanzar un máximo de 77.3 g/L al final del cultivo. Con una velocidad específica de crecimiento media de 0.037 h^{-1} .

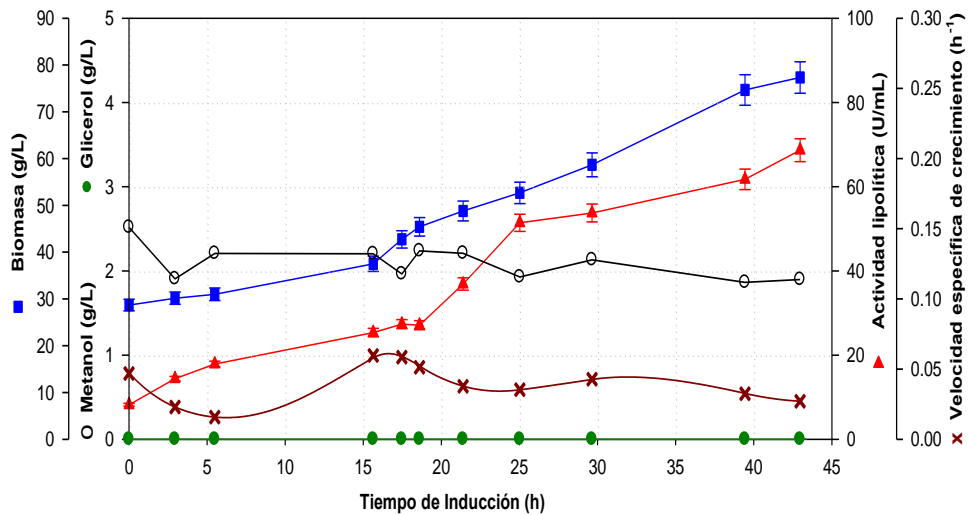


Figura 6.1: Evolución de las variables un cultivo semicontinuo utilizando glicerol como cosustrato sobre una μ de 0.02 h^{-1} y 2 g/L de metanol en una cepa de *P. pastoris* con fenotipo Mut^s.

Con respecto a las fuentes de carbono, se observa que el glicerol se encuentra en condiciones limitantes ya que no se detecta acumulación del mismo en el medio de cultivo durante la fase de inducción. El metanol permaneció cercano al

valor de la consigna de 2 g/L a lo largo de todo el bioproceso. Se detecta actividad lipolítica al final de la fase de transición, alcanzándose un valor máximo de 74.6 U/mL al final de la fase de inducción.

En la tabla 6.1 se comparan los resultados obtenidos de actividad lipolítica máxima, y de velocidades específicas medias con los valores obtenidos en trabajos previos de Arnau et al., (2011) utilizando las mismas condiciones de cultivo con la cepa Mut^s y de Barrigón et al., (2013) utilizando metanol como única fuente de carbono.

Tabla 6.1: Comparación de las velocidades específicas de producción y consumo utilizando sustratos mixtos, con glicerol a una μ de 0.02 h⁻¹, manteniendo la concentración de metanol a 2 g/L para la producción de ROL utilizando los fenotipos Mut^s y Mut⁺ de *Pichia pastoris* en una estrategia en semicontinuo.

Variables	Gli=0.02h ⁻¹ Met=2g/L Mut ⁺	Arnau et al., 2011 Gli=0.02h ⁻¹ Met=2g/L Mut ^s	Barrigón et al., 2013 Metanol 2 g/L Mut ⁺
Actividad Lipolítica Máx. (U/mL)	74.6	471	103
q _{s,met} media (g _{met} /g·h)	0.128	0.042	0.190
q _{s,gli} media (g _{gli} /g·h)	0.031	0.037	---
q _p media (U/g·h)	43.9	149	106
μ _{media} (h ⁻¹)	0.037	0.025	0.043
Y _{P/S} (U/g _{met})	343	3542	557

Desde el punto de vista de actividad final la estrategia utilizada no mejora ninguna de las dos previamente implementadas tanto con Mut^s con sustratos mixtos como con Mut⁺ utilizando metanol como única fuente de carbono. Probablemente la presencia de glicerol, a pesar de ser limitante, disminuye la capacidad del promotor *P_{AOX1}* y como consecuencia la actividad final. Esta hipótesis se puede confirmar mediante la comparación de las velocidades específicas obtenidas en cada proceso.

El hecho de que la velocidad específica de crecimiento preprogramada sobre glicerol (0.02 h⁻¹) sea menor que la observada (0.037 h⁻¹) es debida a la contribución del metanol en la formación de biomasa. En cepas de fenotipo Mut^s, debido a la baja velocidad de crecimiento sobre metanol, el cosustrato es prácticamente el responsable de todo el crecimiento del microorganismo, mientras que en el fenotipo Mut⁺ ambos sustratos contribuyeron al crecimiento. Las velocidades específicas de consumo de glicerol alcanzadas para ambos fenotipos son similares, lo que indica que la asimilación de glicerol por parte de *Pichia* es independiente del fenotipo utilizado, hecho que a priori era de esperar.

Mayores diferencias se observan cuando se comparan las velocidades específicas medias de consumo de metanol del fenotipo Mut⁺. Con sustratos mixtos se alcanza el 67% del valor obtenido utilizando metanol como única fuente de carbono al mismo punto de consigna. Esto indica claramente que la presencia de glicerol produce una represión parcial del P_{AOX1} afectando negativamente a la velocidad de consumo de metanol. La comparación es todavía más negativa al considerarse el fenotipo Mut^s. Sin embargo esta disminución tan drástica viene motivada por el tipo de fenotipo utilizado. Según la bibliografía, el fenotipo Mut^s tiene entre el 10 y el 20% de capacidad de degradar metanol comparado con el fenotipo Mut⁺. En este ensayo la velocidad específica de consumo de metanol del fenotipo Mut^s es del 22% comparado con la Mut⁺ creciendo sobre metanol como única fuente de carbono y un 33% al compararse cuando se utiliza glicerol como cosustrato.

La menor producción de ROL detectada tiene un reflejo en el valor de la q_p media, ésta es un 41% menor comparada con la alcanzada sobre metanol. En la tabla 6.2 se muestra la comparación del rendimiento, productividades volumétricas y específicas para las tres estrategias. Comparando cualquier parámetro de producción la estrategia utilizando glicerol como cosustrato con el fenotipo Mut⁺ no mejora los resultados obtenidos utilizando metanol como única fuente de carbono, donde los valores son del orden del 50% superiores a los obtenidos en este trabajo, siendo mucho más bajos cuando se comparan con los obtenidos en el fenotipo Mut^s, demostrándose que para estas condiciones en la producción de ROL con *P. pastoris* el comportamiento de sustratos mixtos (glicerol-metanol) en el fenotipo Mut⁺ no ha representado una buena alternativa en la mejora de la productividad del bioproceso. Hasta ahora, los trabajos comparativos con ambos fenotipos al igual que éste, han demostrado que la producción de ROL no es comparable entre las cepas Mut⁺ y Mut^s, aunque se empleen estrategias de cultivo similares (Cos et al., 2005).

Tabla 6.2: Comparación de los parámetros de producción de un cultivo semicontinuo utilizando sustratos mixtos, con glicerol a una μ de 0.02 h^{-1} y metanol a 2 g/L para la producción de ROL utilizando los fenotipos Mut^s y Mut^+ de *Pichia pastoris* en una estrategia en semicontinuo.

Variables	$\text{Gli}=0.02\text{h}^{-1}$ $\text{Met}=2\text{g/L Mut}^s$	Arnau et al., 2011 $\text{Gli}=0.02\text{h}^{-1}$ $\text{Met}=2\text{g/L}$ Mut^s	Barrigón et al., 2013 $\text{Metanol } 2\text{ g/L Mut}^+$
$Y_{P/X}$ (U/g)	965	6373	2004
Productividad volumétrica (U/L·h)	1094	5416	2437
Productividad específica (U/g·h)	14	73	48

No obstante, debido a los resultados poco satisfactorios, se realizaron dos cultivos adicionales; en uno de ellos se incrementó la velocidad específica de crecimiento con glicerol a 0.05 h^{-1} manteniendo la concentración de metanol a 2 g/L ; en el segundo cultivo se disminuyó la concentración de metanol a 1.5 g/L y μ sobre glicerol a 0.02 h^{-1} . En estos dos cultivos no se evidenciaron valores significativamente diferentes a los obtenidos en la fermentación utilizando 2 g/L de metanol y glicerol a 0.02 h^{-1} . Hay que destacar, que debido a los resultados que se observaron en este capítulo se concluye que este proceso no se presenta adecuado como metodología para el incremento en la producción de la ROL.

6.3.2 Evaluación de la pureza del producto cuando se utiliza la estrategia de alimentación con sustratos mixtos con control en línea con metanol y alimentación exponencial con glicerol.

Uno de los principales inconvenientes de los sistemas de expresión de *P. pastoris* es la degradación proteolítica post-secretora de productos recombinantes (Potvin et al., 2012). La actividad de la proteasa en el sobrenadante se puede medir con un ensayo de actividad usando caseína conjugado con un marcador fluorescente como sustrato. Procedimiento descrito en el apartado 3.3.5. Este ensayo se realiza con la finalidad de comprobar si la baja actividad de la ROL obtenida en los ensayos realizados en este capítulo está asociada con la presencia de proteasas en el medio de cultivo.

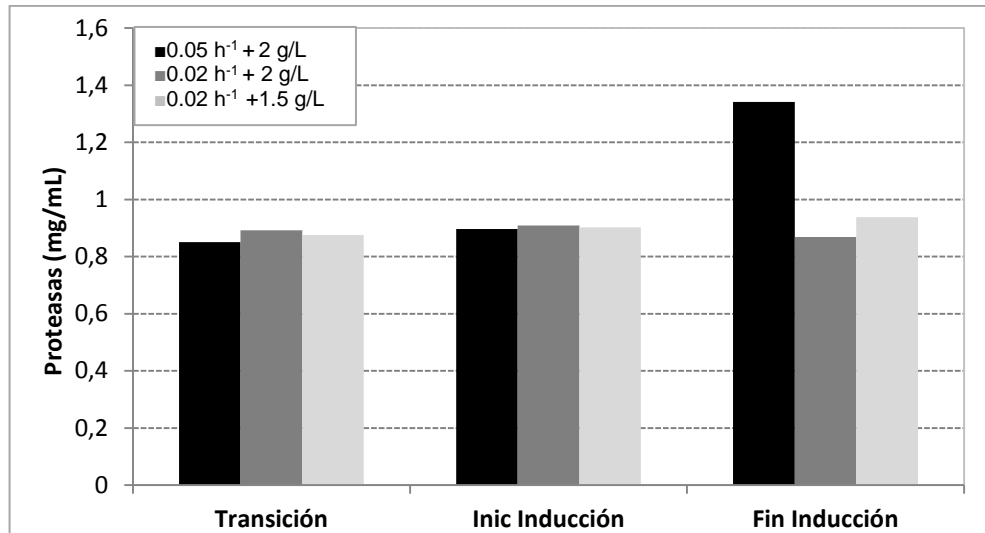


Figura 6.7: Evolución de la actividad proteolítica en diferentes puntos de los bioprocesos realizados en este capítulo. ■ 2 g/L de metanol y glicerol a μ de 0.05 h^{-1} ; ■ 2 g/L de metanol y glicerol a μ de 0.02 h^{-1} ; ■ 1.5 g/L de metanol y glicerol a μ de 0.02 h^{-1}

Las proteasas generalmente son intracelulares, se encuentran en el medio durante el crecimiento a altas densidades celulares, especialmente cuando se utiliza metanol como sustrato inductor (Potvin et al., 2012). La figura 6.7, muestra la concentración de proteasas detectada en diferentes momentos del cultivo para los tres cultivos realizados en este capítulo. En la fase de transición y al inicio de la fase de inducción ($\approx 5 \text{ h}$) todos los cultivos presentan valores similares de presencia de proteasas, pero al final de la inducción, el cultivo donde se utilizó una mayor velocidad de crecimiento con glicerol, presentó un incremento significativo en los niveles de proteasas en el medio. la aparición de proteasas extracelulares en la fase final de la fermentación con la consecuente degradación proteolítica de las proteínas recombinantes producidas en *P. pastoris* está ampliamente descrita por algunos autores (Kobayashi et al., 2000).

Los datos presentados en la figura 6.8 muestran los resultados de la actividad específica del producto recombinante en las tres estrategias de cultivo, se observa que la estrategia donde la μ de glicerol era de 0.02 h^{-1} y metanol a 2 g/L presenta los más altos valores indicando una mayor pureza del producto obtenido. Siendo la pureza del producto muy inferior en los datos obtenidos cuando el glicerol se utilizó a una mayor velocidad específica de crecimiento.

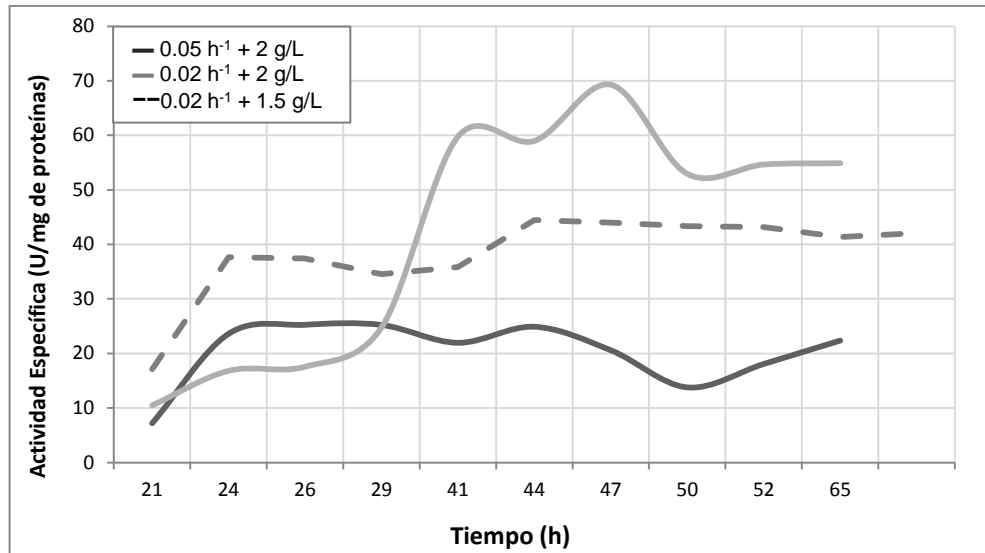


Figura 6.8: Evolución de la actividad lipolítica específica en cultivos semicontinuos con sustratos mixtos alimentado con glicerol exponencial preprogramada y *sustrato* de metanol. — 2 g/L de metanol y glicerol a μ de 0.05 h⁻¹; — 2 g/L de metanol y glicerol a μ de 0.02 h⁻¹; -- 1.5 g/L de metanol y glicerol a μ de 0.02 h⁻¹

Adicionalmente se mide el contenido intracelular de la enzima AOX en los cultivos realizados. Esta enzima es la responsable del primer paso en la asimilación de metanol ya que, en presencia de oxígeno, el metanol es oxidado a formaldehído y agua oxigenada. La transcripción del gen necesario para la síntesis de la enzima AOX está bajo el control del promotor P_{AOX1} , el mismo que regula la transcripción del gen de la ROL cuando está en condiciones inductoras.

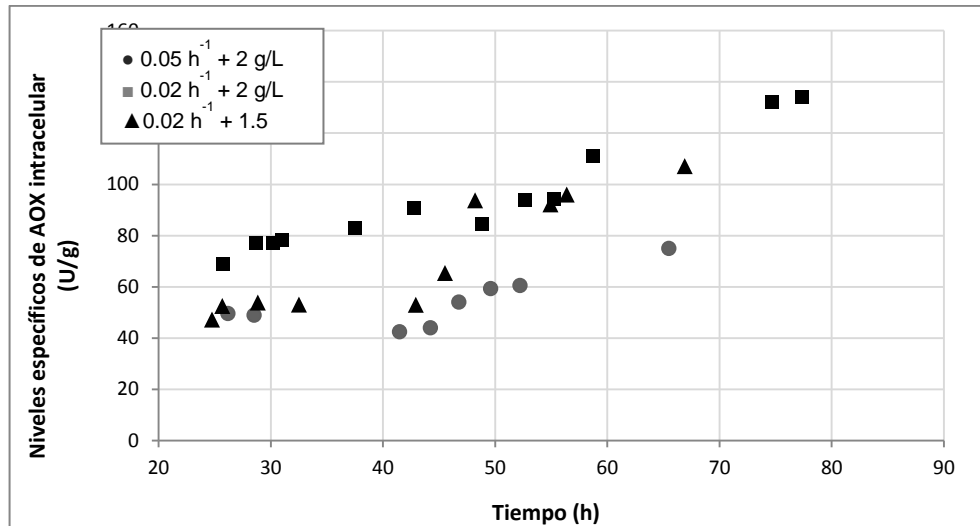


Figura 6.9: Evolución de los niveles específicos de AOX intracelular en cultivos semicontinuos con sustratos mixtos alimentado con glicerol exponencial preprogramada y *set-point* de metanol. ● 2 g/L de metanol y glicerol a μ de 0.05 h^{-1} ; ■ 2 g/L de metanol y glicerol a μ de 0.02 h^{-1} ; ▲ 1.5 g/L de metanol y glicerol a μ de 0.02 h^{-1}

Se ha descrito que cambios bruscos en los niveles residuales de metanol a menudo resulta en pérdida de la actividad de AOX y también en muerte celular (Chiruvolu et al., 1997). Las medidas de la actividad de la AOX se muestran en la figura 6.9, Se puede observar un perfil similar en todos los cultivos, debido a que durante toda la fase de inducción, se incrementan los niveles intracelulares de la AOX. Estos datos indican que durante la fase de producción a pesar de la presencia de glicerol el P_{AOX1} se mantiene inducido, encontrándose una mayor actividad cuando la coadición de glicerol se realizó a la velocidad específica de crecimiento más baja. Este comportamiento se encuentra relacionado con los niveles de actividad proteolítica, coincidiendo los mayores niveles de actividad proteolítica con los menores niveles de actividad AOX.

6.4 Conclusiones

En este capítulo se ha estudiado el efecto de la alimentación con sustratos mixtos a una concentración de metanol residual en el medio constante y una velocidad específica de crecimiento preprogramada utilizando glicerol como cosustrato, en la producción de ROL en un cultivo en semicontinuo, obteniéndose las siguientes conclusiones:

Los resultados obtenidos han mostrado que la producción de ROL en *P. pastoris* no es comparable entre las cepas Mut⁺ y Mut^s aunque se empleen estrategias de cultivo similares. La presencia del glicerol como cosustrato no mejora la producción, ni la velocidad específica de producción, siendo mucho más eficaz para cultivos de fenotipo Mut^s en los que la asimilación del metanol se encuentra muy limitada por tener sólo disponible el gen de la AOX2 operativo para la degradación del primer paso de metanol a formaldehído.

Las productividades volumétricas y específicas encontradas en los experimentos son mucho más bajas que las encontradas en experimentos donde se utiliza metanol como única fuente de carbono con el fenotipo Mut⁺. Esto claramente indica que para este fenotipo incluso a velocidades específicas de crecimiento preprogramadas de glicerol bajas se produce una inhibición de la expresión controlada por P_{AOX1} , como se demuestra al comparar las velocidades específicas de consumo de metanol (0.19 vs 0.13 g_{met}/g·h).

Se ha observado que la concentración de proteasas aumenta al aumentar la μ de glicerol presentando valores altos durante las últimas horas de cultivo afectando directamente la pureza del producto final obtenida en términos de actividad específica por mg de proteína.

Un control directo de la velocidad específica de crecimiento puede ser realizado aplicando una estrategia de alimentación exponencial preprogramada. Sin embargo, esta estrategia resulta ser inadecuada al utilizar altas velocidades específicas de crecimiento que pueden llevar a que, a pesar de la presencia

limitante de glicerol, se produzca una inhibición del promotor AOX1 y de esta forma se reduzca la producción y calidad de la proteína recombinante.

6.5 Bibliografía

- Arnau, C., Ramon, R., Casas, C., y Valero, F. (2010). Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(6), 494–500.
- Arnau, C., Casas, C., y Valero, F. (2011). The effect of glycerol mixed substrate on the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system. *Biochemical Engineering Journal*, 57, 30–37.
- Barrigón, J. M., Montesinos, J. L., y Valero, F. (2013). Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut+ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures? *Biochemical Engineering Journal*, 75, 47–54.
- Chiruvolu, V., Gregg, J. M., y Meagher, M. M. (1997). Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 277–283.
- Choi, D. B., y Park, E. Y. (2006). Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 41(2), 390–397.
- Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J. L., Ferrer, P., Cregg, J. M., y Valero, F. (2005). combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 116, 321–335.
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., Valero, F. (2006a). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microbial Cell Factories*, 5, 17.
- Cos, O., Ramon, R., Montesinos, L., y Valero, F. (2006b). A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 95(1), 145–154.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., y Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Nature Publishing Group*.
- D'Anjou, M. C., y Daugulis, A. J. (2000). Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. *Biotechnology Letters*, 22, 341–346.
- Hellwig, S., Emde, F., Raven, N. P., Henke, M., Van Der Logt, P., y Fischer, R. (2001). Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 74(4), 344–52.
- Jungo, C., Marison, I., y Von Stockar, U. (2007a). Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *Journal of Biotechnology*, 128(4), 824–37.
- Jungo, C., Schenk, J., Pasquier, M., Marison, I. W., y Von Stockar, U. (2007b). A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 131(1), 57–66.

- Katakura, Y., Zhang, W., Zhuang, G., Omasa, T., Kishimoto, M., Goto, Y., y Suga, K.-I. (1998). Effect of methanol concentration on the production of human Pz-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(5), 482–487.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., y Ohmura, T. (2000). High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *Microbial Physiology and Biotechnology*, 89(1), 55–61.
- McGrew, J. T., Leiske, D., Dell, B., Klinke, R., Krasts, D., Wee, S. F., y Harrington, K. (1997). Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants. *Gene*, 187(2), 193–200.
- Potvin, G., Ahmad, A., y Zhang, Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 91–105.
- Ramón, R., Ferrer, P., y Valero, F. (2007). Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 130(1), 39–46.
- Thorpe, E. D., Anjou, M. C., y Daugulis, A. J. (1999). Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 21, 669–672.
- Xie, J., Zhang, L., Ye, Q., Zhou, Q., Xin, L., Du, P., y Gan, R. (2003). Angiostatin production in cultivation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 25(2), 173–177.
- Xie, J., Zhou, Q., Du, P., Gan, R., y Ye, Q. (2005). Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2-3), 210–216.
- Zalai, D., Dietzsch, C., Herwig, C., y Spadiut, O. (2012). A dynamic fed batch strategy for a *Pichia pastoris* mixed feed system to increase process understanding. *Biotechnology Progress*, 28(3), 878–86.
- Zhang, W., Hywood Potter, K. J., Plantz, B. A., Schlegel, V. L., Smith, L. A., y Meagher, M. M. (2003). *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 210–5.

Capítulo 7

**Producción de ROL recombinante
mediante la utilización de glicerol/sorbitol y
metanol en cultivo semicontinuo utilizando
alimentación exponencial preprogramada**

Contenido

Producción de ROL recombinante mediante la utilización de glicerol/sorbitol y metanol en cultivo semicontinuo utilizando alimentación exponencial preprogramada.....	135
7.1 Resumen.....	137
7.2 Introducción.....	139
7.3 Resultados y Discusión.....	144
7.3.1 Comparación de los cultivos realizados bajo las mismas condiciones utilizando como cosustratos glicerol o sorbitol.	145
7.3.2 Cultivo semicontinuo alimentado con sustratos mixtos con una velocidad específica de crecimiento sobre glicerol a 0.04 h^{-1} y metanol a 0.02 h^{-1}	150
7.4 Conclusiones.....	156
7.5 Bibliografía.....	157

Producción de ROL recombinante con *P. pastoris* mediante la utilización de Glicerol/Sorbitol y Metanol en cultivo semicontinuo utilizando alimentación exponencial preprogramada

7.1 Resumen

El desarrollo experimentado de las técnicas de biología molecular e ingeniería genética a lo largo de las últimas décadas, no se ha dirigido tan sólo hacia la búsqueda de nuevas herramientas moleculares que faciliten la expresión de proteínas recombinantes, sino que paralelamente, también se ha enfocado hacia el estudio de la optimización de los bioprocesos. En este ámbito se han abierto diversas líneas de investigación en *P. pastoris*, potenciando la secreción de proteínas recombinantes. Una de estas vías es la implementación de nuevos esquemas de alimentación, en este capítulo se utiliza un control de la velocidad específica de crecimiento; Es un sistema de ajuste de la velocidad de adición del sustrato basado en la ecuación del balance de la biomasa producida y sustrato consumido, para teóricamente, mantener una velocidad específica de crecimiento constante.

Este capítulo estudia la influencia de la alimentación mixta de glicerol-metanol y sorbitol-metanol sobre la productividad de la proteína recombinante realizando cultivos semicontinuos con adición preprogramada de todos los sustratos para conseguir una velocidad específica de crecimiento constante y por consiguiente, trabajar siempre en condiciones limitantes, en una cepa de *P. pastoris* con fenotipo Mut⁺, llevando a cabo la alimentación de los sustratos de forma independiente.

La máxima velocidad específica de crecimiento de la cepa nativa de *P. pastoris* creciendo sobre metanol como única fuente de carbono, ha sido previamente reportado como 0.09 h⁻¹, sin embargo, este valor se ve reducido a 0.06 h⁻¹ cuando *P. pastoris* está produciendo ROL. Los valores utilizados para este capítulo fueron más bajos que la máxima velocidad específica de crecimiento reportada (0.06 h⁻¹), con la finalidad de evitar la posible acumulación de sustratos durante la fase de inducción.

La estrategia de alimentación mixta se llevó a cabo con metanol como sustrato inductor y glicerol o sorbitol como cosustrato para el crecimiento de la biomasa, para llevar a cabo el cultivo se utilizó un sistema de alimentación exponencial pre-programada con sustratos mixtos alimentados de forma independiente. La estrategia de alimentación exponencial con sustratos mixtos fue implementada en tres experimentos en semicontinuo: sorbitol 0.02 h^{-1} + metanol 0.02 h^{-1} ; glicerol 0.02 h^{-1} + metanol 0.02 h^{-1} ; glicerol 0.04 h^{-1} + metanol 0.02 h^{-1} .

La máxima actividad lipolítica (124 U/mL) se alcanzó cuando se utilizó glicerol y metanol a una misma μ de trabajo. La producción celular sobre los sustratos en el medio conteniendo sorbitol es muy bajo con respecto al rendimiento celular con glicerol, pero se observa que al incrementar la μ de glicerol hay una disminución significativa de su efecto sobre las células. A diferencia de la cepa Mut^s, la producción máxima expresada en términos de actividad, fue la obtenida utilizando glicerol como cosustrato con la cepa Mut^r.

El cultivo realizado con glicerol como cosustrato a una velocidad específica de crecimiento de 0.02 h^{-1} presenta valores superiores en cuanto a la productividad volumétrica y al $Y_{P/X}$. Al utilizar glicerol y metanol como cosustratos se observa un aumento significativo de la actividad proteolítica independientemente de la velocidad específica de crecimiento sobre glicerol, algo que no ocurre cuando se utilizó sorbitol como cosustrato.

Los resultados muestran que la productividad específica alcanzada en cultivo con sustratos mixtos cultivados sobre sorbitol y metanol es más alta que cuando se utilizó glicerol como cosustrato. Además, se muestra que al incrementar la μ de alimentación con sustratos mixtos glicerol-metanol hay una clara disminución en el rendimiento $Y_{P/X}$ y en las productividades específicas y volumétricas.

7.2 Introducción

La estrategia para la producción de proteínas heterólogas en cultivos de alta densidad celular, empleando *P. pastoris* como sistema de expresión, involucra fermentaciones en continuo y semicontinuo (fermentación en discontinuo alimentado o *fed-batch*). En esta última la alimentación es controlada para asegurar que la concentración de sustrato no alcance niveles inhibitorios. Hasta ahora se han reportado en la literatura diversas estrategias de alimentación, generalmente utilizando metanol como única fuente de carbono en la etapa de inducción, siendo las más implementadas las que se muestran a continuación: (Potvin et al., 2012; Salehmin et al., 2013)

- Cultivo limitado por temperatura.
- Cultivo limitado por oxígeno.
- Control de oxígeno disuelto.
- Control del pH.
- Control de la concentración de metanol.
- Control de la velocidad específica de crecimiento.

La estrategia de control de la velocidad específica de crecimiento (μ) en lazo abierto (*open loop*), se ha desarrollado para permitir que las células crezcan a velocidades específicas aproximadamente constantes. Es un método simple pero eficiente que ha sido utilizado con éxito para cultivos de altas densidades celulares en varios microorganismos recombinantes y no recombinantes; si la μ se mantiene en un rango apropiado se espera mantener una condición metabólica estable del microorganismo que podría resultar en máxima productividad del bioproceso (Shojaosadati et al., 2008).

En los últimos años el control automático en lazo abierto de la μ es considerado el parámetro clave en muchos estudios de bioprocesos (Chenikher et al., 2010). Es un sistema de ajuste de la velocidad de adición del sustrato, basado en la ecuación del balance de biomasa y sustrato para, teóricamente, mantener una velocidad específica de crecimiento constante. Esta estrategia de alimentación puede ser denominada; alimentación exponencial pre-programada, cultivo limitado en metanol, control *open loop*, control μ -stat. (Potvin et al., 2012). La principal ventaja de esta estrategia es la facilidad de su implementación y que la μ suele mantenerse relativamente constante en torno al punto de consigna, mejorando la reproducibilidad

del proceso y permitiendo estudiar los efectos de la μ sobre la producción de la proteína heteróloga.

Aunque este sistema es fácil de implementar, tiene el inconveniente de que pueden aparecer posibles perturbaciones que afectarían el sistema, en cuyo caso, el microorganismo podría crecer a una μ diferente de la preprogramada con un efecto negativo sobre la producción óptima de la proteína (Cos et al., 2005a). Continuando con las estrategias de alimentación en un cultivo en semicontinuo, se han implementado estrategias de operación que utilizan sustratos mixtos bajo el promotor P_{AOX1} . Bajo la acción de este promotor el metanol se utiliza como sustrato inductor haciendo uso de otra fuente de carbono como cosustrato para el crecimiento celular.

Se han evaluado fuentes de carbono que podrían servir como cosustratos en la expresión de proteínas controlado por el promotor P_{AOX1} . Inan y Meagher., (2001) compararon fuentes de carbono como: alanina, sorbitol, manitol y trehalosa, en términos de su capacidad para soportar el crecimiento y la expresión de β -Gal por *P. pastoris* con el fenotipo Mut^s en frascos de cultivo; Sus resultados indican que la cepa Mut^s creciendo en un medio conteniendo estas fuentes de carbono con metanol al 0.5% expresan una mayor cantidad de β -Gal comparado con la cepa Mut⁺ creciendo sobre metanol como única fuente de carbono. Xie et al., (2005) estudiaron los efectos del glicerol, sorbitol, ácido acético y ácido láctico mezclados con metanol usando una cepa Mut^s y se obtuvo la más baja producción de angiostatina en el medio de fermentación con acetato y metanol. El mayor nivel de proteína recombinante fue de 191 mg/L obtenida con ácido láctico aunque éste se acumuló hasta 6.3 g/L.

Una fuente de carbono muy utilizada como cosustrato es el sorbitol, el beneficio de usar sorbitol y metanol durante la fase de inducción en cultivos semicontinuos de *P. pastoris* es que la presencia de sorbitol en concentraciones elevadas (40 g/L) no inhibe el promotor P_{AOX1} , además no afecta el nivel de expresión de la proteína recombinante y permite el incremento de la productividad del proceso al compararlo con el uso de metanol como única fuente de carbono. (Sreekrishna et al., 1997; Thorpe et al., 1999; Xie et al., 2005). Por ejemplo, se ha reportado que, en comparación con un cultivo de alta densidad celular alimentado con metanol como única fuente de carbono durante la fase de inducción, la productividad de la proteína recombinante fue más alta al utilizar alimentación mixta de sorbitol-metanol, pero fue

más baja cuando se usó glicerol-metanol. Esto con toda probabilidad se debe a que, en contraste con glicerol, el sorbitol es una fuente de carbono no represiva con respecto al promotor P_{AOX1} . (Thorpe et al., 1999).

Jungo et al., (2007a), realizaron un estudio cuantitativo de la influencia de la relación sorbitol-metanol para la producción de avidina recombinante utilizando una cepa Mut^+ de *P. pastoris*, implementando la estrategia de alimentación mixta con una mezcla de 43% de metanol y 57% de sorbitol alimentado a una μ de 0.03 h^{-1} durante la etapa de inducción. Confirman que la acumulación de sorbitol en el medio de cultivo no afecta la productividad de la avidina recombinante, además se demuestra que al utilizar la estrategia con sustratos mixtos se obtienen valores similares de producción y en algunos casos superiores a la estrategia donde se utiliza metanol como única fuente de carbono.

Ramón et al., (2007) utilizó la estrategia de alimentación con sustratos mixtos (sorbitol y metanol) en un cultivo semicontinuo para la producción de ROL con el fenotipo Mut^s a una concentración residual de 0.5 g/L de metanol. Se obtuvo un incremento en la producción de la proteína heteróloga con este fenotipo, con esta estrategia de cultivo no se evidenció la reducción drástica de la velocidad específica de producción que se observa después de iniciada la fase de inducción cuando el metanol es utilizado como única fuente de carbono. Además se obtiene un incremento significativo de la productividad volumétrica y específica del proceso al utilizar sustratos mixtos.

Arnau et al., (2010), realizó un estudio sistemático del efecto de la concentración de metanol y de la velocidad específica de crecimiento en cultivos semicontinuos utilizando sorbitol como cosustrato, desarrollando diferentes cultivos donde la consigna de metanol se mantuvo a 0.5, 2 y 4 g/L, el sorbitol se alimentó según una adición exponencial preprogramada manteniendo la μ a 0.01 y 0.02 h^{-1} . Los resultados indican que la concentración de metanol es un parámetro clave para la producción de ROL, alcanzando los valores más elevados al mantener la concentración fijada a 2 g/L en el medio de cultivo. Los efectos de la μ utilizada no representan diferencias significativas en cuanto a la productividad del proceso, alcanzándose valores similares en ambas velocidades específicas probadas bajo la misma consigna de metanol.

Por otro lado, el glicerol al igual que el sorbitol ha sido muy utilizado en ensayos con sustratos mixtos, demostrándose que la presencia de glicerol durante la fase de inducción puede llevar a mejorar la productividad (McGrew et al., 1997; Katakura et al., 1998; Zhang et al., 2003). No obstante hay que tener en cuenta que para conseguir una mejora de la productividad del bioproceso, se debe realizar la adición de glicerol de manera que su concentración en el medio de cultivo sea prácticamente cero (glicerol limitante) evitando que alcance niveles suficientes para reprimir el $P_{A_{OX1}}$ o cause la excreción de metabolitos inhibitorios tales como etanol o acetato (Hellwig et al., 2001).

En este sentido Zhang et al., (2003) analizaron la influencia de la alimentación mixta (glicerol-metanol) en una cepa Mut⁺ de *P. pastoris*, aplicando una estrategia de alimentación mixta con una μ_{gli}/μ_{Met} de 1 a 4 y un set-point de metanol a 0.015 h^{-1} ; Reportan que el parámetro óptimo para el crecimiento celular y la producción de la proteína recombinante es una relación μ_{gli}/μ_{Met} alrededor de 2. Jungo et al., (2007b) investigaron el efecto de la μ sobre la productividad específica del producto, usando un perfil de alimentación exponencial preprogramado con una mezcla de 35% de glicerol y 65% metanol, observando que para μ más altas de 0.02 h^{-1} la productividad específica se incrementa ligeramente. Sin embargo, una gran disminución de la productividad específica fue observada a μ más bajas de 0.02 h^{-1} . En otros estudios se afirma que el nivel óptimo de expresión de la proteína recombinante no es alcanzable con mezclas de glicerol y metanol, debido a una represión parcial del promotor $P_{A_{OX1}}$ causada por la presencia del glicerol en el medio de cultivo, esto puede dar lugar a una disminución en la productividad específica de la proteína de interés (Sreekrishna et al., 1997; Hellwig et al., 2001).

Arnau et al., (2011) estudió la producción de ROL con el fenotipo Mut^s realizando diferentes cultivos en semicontinuo donde la μ se mantiene fija en 0.02 , 0.05 y 0.1 h^{-1} , mediante la adición exponencial de glicerol y el metanol se utiliza como un sustrato inductor a una consigna de 2 g/L . Los resultados describen que cuando la relación entre μ_{gli}/μ_{met} es superior a 4, se obtienen valores significativamente inferiores en todos los parámetros vinculados a la producción de la proteína recombinante de interés. De igual manera, describen que la actividad lipolítica disminuye durante las últimas horas de cultivo probablemente asociado a un incremento en la actividad proteolítica. Este hecho no es observable cuando se trabaja con sorbitol como cosustrato. Además, reportan que la productividad específica es superior cuando se utiliza el sorbitol como cosustrato, lo que

demuestra que el sorbitol es más eficiente que el glicerol desde el punto de vista de la productividad celular. En este mismo trabajo describen que el consumo de metanol es mayor cuando se utilizan sustratos mixtos en la producción de ROL con el fenotipo Mut^s que utilizando metanol como única fuente de carbono.

Bajo todas estas observaciones, fué interesante llevar a cabo el estudio de la influencia de sustratos mixtos (glicerol-metanol) en la producción de la ROL expresada en *P. pastoris* fenotipo Mut^t. En este capítulo se realizaron fermentaciones en semicontinuo utilizando sustratos mixtos con la finalidad de determinar cómo la concentración limitante de los sustratos puede afectar la producción de la ROL. Se trabajó a una consigna de metanol de 0.02 h^{-1} y dos μ de glicerol ($0.02 - 0.04 \text{ h}^{-1}$) y además, un ensayo con sorbitol a una μ de 0.02 h^{-1} . La alimentación de los sustratos se llevó a cabo de forma independiente controlando la μ con una adición exponencial preprogramada de los sustratos.

7.3 Resultados y Discusión

La máxima velocidad específica de crecimiento de la cepa nativa de *P. pastoris* creciendo sobre metanol como única fuente de carbono, ha sido previamente reportado como 0.09 h^{-1} (Zhang et al., 2000), sin embargo, este valor se ve reducido a 0.06 h^{-1} cuando *P. pastoris* está produciendo ROL (Cos et al., 2005a). En consecuencia, se ha seleccionado una μ de metanol a 0.02 h^{-1} para esta serie de experimentos. Este valor es más bajo que la máxima velocidad específica de crecimiento reportada para ROL. Se utiliza con la finalidad de evitar la posible acumulación de sustratos durante la fase de inducción (Barrigón et al., 2013). La estrategia de alimentación preexponencial con sustratos mixtos fue implementada para diseñar tres experimentos en semicontinuo como son: sorbitol 0.02 h^{-1} + metanol 0.02 h^{-1} , glicerol 0.02 h^{-1} + metanol 0.02 h^{-1} y glicerol 0.04 h^{-1} + metanol 0.02 h^{-1} , el seguimiento de la concentración de los sustratos se realiza tomando muestras puntuales en el tiempo para su análisis posterior por HPLC (*apartado 3.4.6*). Las fermentaciones fueron realizadas para investigar el efecto de una μ fija utilizando sustratos mixtos durante la etapa de producción sobre la productividad del sistema.

Las fermentaciones en semicontinuo se realizaron utilizando la metodología descrita en el *apartado 3.3*. Con una estrategia de alimentación mixta con metanol como sustrato inductor y glicerol o sorbitol como cosustrato para el crecimiento de la biomasa, para realizar el cultivo se utilizó un sistema de alimentación exponencial preprogramada para ambos sustratos. Como ya se ha comentado en capítulos anteriores, los cultivos se pueden diferenciar en tres etapas, una primera etapa en discontinuo de consumo de glicerol, seguidamente la etapa de transición donde se suministran conjuntamente dos fuentes de carbono (Cos et al., 2005a). Finalmente se llevó a cabo una tercera etapa de inducción donde se suministraron tanto el sustrato inductor como el cosustrato de manera exponencial pre-programada a una μ seleccionada para cada uno. Los cálculos del caudal inicial de adición de las fuentes de carbono para cada cultivo se realizaron utilizando la *fórmula 3.2* y *3.3* descrita en el *apartado 3.3.4*. Los valores que se utilizan para calcular el caudal inicial de glicerol son: $V_0=2.1\text{L}$; $Y_{x/s}=0.5 \text{ g/g}_{\text{gli}}$; $X_0=20 \text{ g/L}$; $S_0=550 \text{ g/L}$, los valores para el cálculo del caudal inicial de sorbitol son: $V_0=2.1\text{L}$; $Y_{x/s}=0.3 \text{ g/g}_{\text{gli}}$; $X_0=19 \text{ g/L}$; $S_0=330 \text{ g/L}$.

7.3.1 Comparación de los cultivos realizados bajo las mismas condiciones utilizando como cosustratos glicerol o sorbitol.

Se realizaron dos fermentaciones, utilizando metanol como sustrato inductor y como cosustrato glicerol o sorbitol, a una velocidad específica de crecimiento de 0.02 h^{-1} para todos los sustratos. El objetivo fue determinar cuál de los dos cosustratos es más interesante desde el punto de vista de producción de ROL. La selección de unas velocidades específicas relativamente bajas tuvieron como objetivo poder comparar con los resultados obtenidos para el fenotipo Mut^s y con el capítulo 6 donde se observó que utilizar una μ de 0.02 h^{-1} y baja concentración de metanol en el medio incrementa las productividades del bioproceso. Además, esto permitirá trabajar en una zona alejada de las $\mu_{\text{máx}}$ para todos los sustratos lo que evitará posibles acumulaciones de cualquiera de los sustratos.

En la figura 7.1 se observa la evolución de las variables principales del proceso con respecto al tiempo de inducción. En la figura se muestra que las fuentes de carbono (glicerol, sorbitol y metanol) se mantienen bajo condiciones limitantes y tanto el sustrato inductor como los cosustratos son consumidos simultáneamente. La figura 7.1A muestra los resultados utilizando glicerol como cosustrato. La evolución de la biomasa es la esperada, con un aumento progresivo durante todo el cultivo hasta alcanzar un máximo de 78.9 g/L al final del mismo, con una velocidad específica de crecimiento media de 0.028 h^{-1} . Este valor es ligeramente superior al valor de consigna, la causa podría ser un efecto combinado del consumo de los dos sustratos.

Como se observa al final de la fase de transición ($t=0$) ya se ha producido ROL, habiéndose desreprimido el P_{AOX1} . Sin embargo, una vez iniciada la fase de inducción su actividad prácticamente se para y no es hasta después de 15 horas cuando se vuelve a observar un aumento de la producción. Este efecto ha sido reportado en las fermentaciones de *P. pastoris* produciendo ROL (Cos et al., 2006), A partir de las 15 horas la producción se incrementa para volver a sufrir una ralentización entre las 25 y 45 horas. No hay ningún dato de los parámetros analizados que pueda indicar cuál puede ser el motivo de esta desaceleración, como tampoco el incremento final que se produce en las últimas horas de cultivo. Claramente el control en lazo abierto de las velocidades específicas de crecimiento actuando sobre la adición de las fuentes de carbono (glicerol y metanol) no garantizan una producción constante de la proteína de interés, siendo necesario

análisis intracelulares para poder identificar la causa de las paradas observadas en la producción.

La actividad lipolítica máxima obtenida fue de 124 U/mL. Un resultado similar se obtuvo en la expresión de la ROL utilizando metanol como única fuente de carbono a una μ de 0.02 h^{-1} (112 U/mL) con el fenotipo Mut⁺ (Barrigón et al., 2013). Sin embargo, al comparar con los resultados reportados por Arnau et al., (2011) para una cepa con fenotipo Mut^s a una μ de glicerol de 0.02 h^{-1} y metanol residual a una concentración de 2 g/L la actividad lipolítica alcanzada fue 4.0 veces superior comparado con los resultados obtenidos con el fenotipo Mut⁺ (Tabla 7.1).

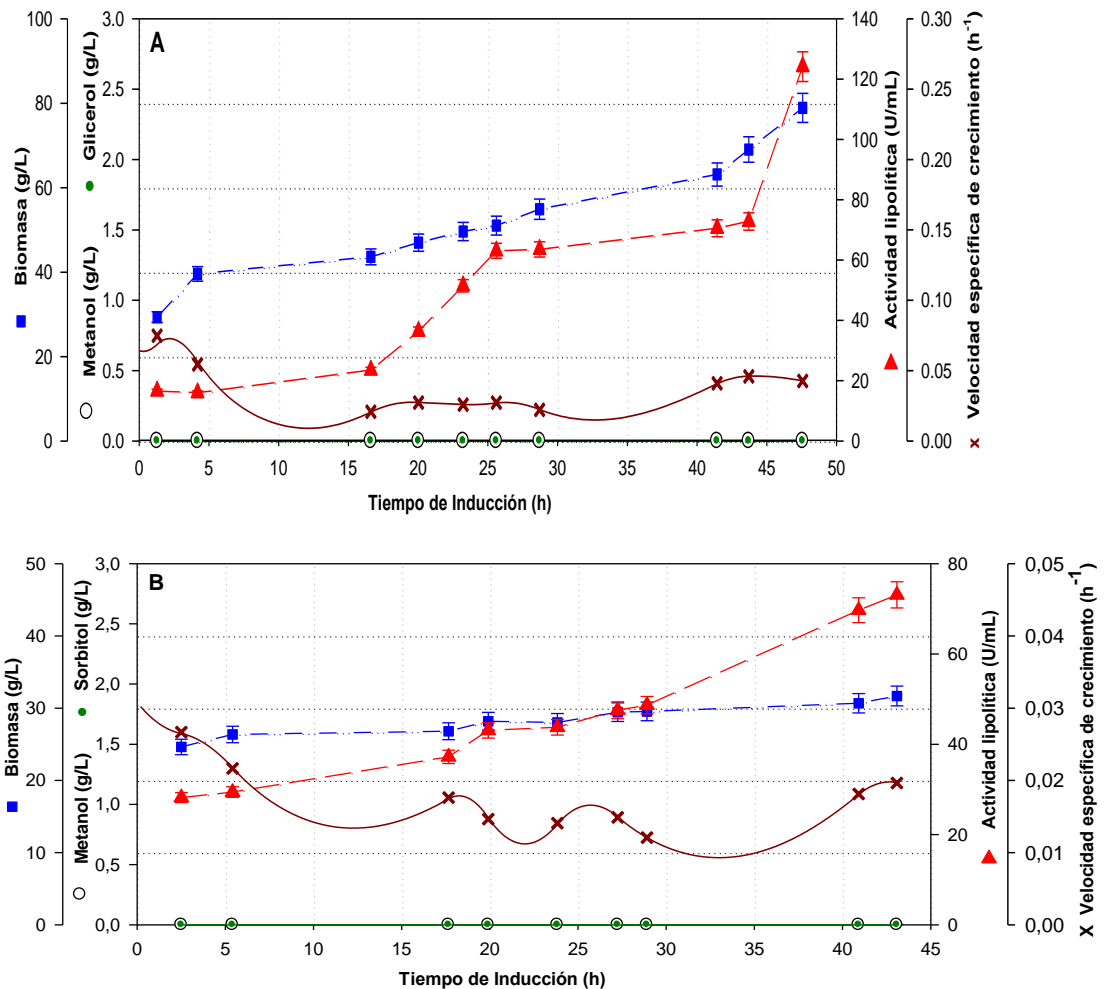


Figura 7.1: Evolución de los parámetros de cultivo en semicontinuo con el fenotipo Mut⁺ utilizando una estrategia de sustratos mixtos manteniendo la μ de metanol a 0.02 h^{-1} y Glicerol (A) o Sorbitol (B) a $\mu=0.02 \text{ h}^{-1}$.

La figura 7.1B corresponde a la evolución de las variables del cultivo utilizando sorbitol como cosustrato. La evolución de la biomasa es muy diferente

comparado con la fermentación que utiliza glicerol como cosustrato (Figura 1A). Se observa un incremento mucho más lento de la misma hasta alcanzar un valor máximo de 31.7 g/L, siendo ésta 2.5 veces inferior a la biomasa obtenida en el ensayo con glicerol. Esto es debido a que el rendimiento biomasa-sustrato para sorbitol ($0.3 \text{ g/g}_{\text{sor}}$) es bastante más bajo que para glicerol ($0.5 \text{ g/g}_{\text{gli}}$).

No se observa acumulación de los sustratos en toda la fase de inducción, por lo tanto se asume que las células consumen todo el sustrato alimentado en la medida que es añadido al medio, lo que revela la utilización simultánea de sorbitol con metanol confirmando los resultados de Jungo et al., (2007a) y Celik et al., (2009). Sin embargo, el valor de la μ se encuentra claramente por debajo del valor de consigna, probablemente ocasionado por una subestimación del caudal de sorbitol al inicio de la fase de inducción. En referencia a la actividad lipolítica se observa en la fermentación con sorbitol, una ralentización en las primeras horas de inducción para posteriormente a partir de las 30 horas presenta un aumento importante hasta alcanzar un valor máximo de 73 U/mL, siendo este valor 3.8 veces inferior al obtenido para la cepa Mut^s utilizando sorbitol a la misma μ con una concentración residual de 0.5 g/L de metanol (Tabla 7.1).

En la tabla 7.1 se comparan los parámetros más representativos relacionados con la producción de ROL utilizando los diferentes cosustratos y se realiza una comparación con trabajos publicados por Arnau et al., (2010-2011) utilizando el fenotipo Mut^s. Se tiene que indicar que el experimento realizado por Arnau et al., (2011) utilizando la combinación glicerol y metanol se realizó a una concentración constante de metanol de 2 g/l. Es conocido que una concentración en el medio de metanol por encima de este valor y hasta unos 3-4 g/l la producción aumenta de manera muy significativa. No se realizó ningún experimento con la cepa Mut^s bajo estas mismas condiciones por lo que la comparación que se va a realizar a continuación tiene que tener en cuenta este hecho. Por lo que respecta a combinación metanol/sorbitol con el fenotipo Mut^s se ha comparado con el experimento en el que el exceso de metanol era el más pequeño, y por consiguiente más cercano a las condiciones de los experimentos reflejados en la figura 1.

La actividad lipolítica máxima obtenida cuando se utiliza glicerol como cosustrato es 1.7 veces superior que al utilizar sorbitol, este comportamiento se observa tanto para el fenotipo Mut^s como para el fenotipo Mut⁺. Sin embargo, el rendimiento producto/biomasa es 1,5 veces superior cuando se utiliza sorbitol,

debido a que se compensa la menor producción de la enzima con los menores niveles de biomasa alcanzados. La productividad volumétrica es mayor 1.6 veces al utilizar glicerol como cosustrato. Al realizar la comparación entre los fenotipos Mut^s y Mut⁺ para ambos cosustratos, se observa que los valores de las productividades y el rendimiento $Y_{P/X}$ son superiores cuando se trabaja con el fenotipo Mut^s y el glicerol como cosustrato al utilizar metanol a una concentración de 2 g/L.

Tabla 7.1: Parámetros de producción de cultivos semicontinuos utilizando sustratos mixtos, para la producción de ROL utilizando el fenotipo Mut⁺ y Mut^s.

Variables	Gli- 0.02 h ⁻¹ Met- 0.02 h ⁻¹ Mut ⁺	Sorb- 0.02 h ⁻¹ Met- 0.02 h ⁻¹ Mut ⁺	Arnau et al., 2011 Gli- 0.02 h ⁻¹ Met- 2 g/L Mut ^s	Arnau et al., 2010 Sorb- 0.02 h ⁻¹ Met- 0.5 g/L Mut ^s
Actividad Lipolítica Máx. (U/mL)	124	73	471	280
$Y_{P/X}$ (U/g)	1573	2307	6373	5817
Productividad volumétrica (U/L·h)	1762	1116	5416.2	3217
Productividad específica (U/g·h)	22	35	73	67
$q_{s,met}$ media (g _{met} /g·h)	0.046	0.12	0.042	0.029
$q_{s,cosust}$ media (g _{glf} /g·h)	0.021	0.028	0.037	0.049
q_p media (U/g·h)	44	50	148	138
μ_{media} (h ⁻¹)	0.028	0.015	0.025	0.016

En la misma tabla se comparan los parámetros de las velocidades específicas de los cultivos utilizando la estrategia de sustratos mixtos. Se puede observar que las velocidades específicas medias de consumo de sustratos son más altas cuando se utiliza sorbitol como cosustrato cuando se trabaja con el fenotipo Mut⁺, exceptuando la velocidad específica de crecimiento que es 1.9 veces superior cuando se utiliza el glicerol. Las velocidades específicas de producción son similares para ambos sustratos, la q_{sMet} media es mayor al utilizar sorbitol como cosustrato, pero al comparar las velocidades específicas de consumo de cosustrato, se puede apreciar que el consumo específico de sorbitol es mayor. De otra parte, si comparamos con los resultados obtenidos con el fenotipo Mut^s los parámetros de las velocidades específicas son mayores que lo reportados para este trabajo.

En la tabla 7.2 se comparan los resultados de los ensayos de alimentación con sustratos mixtos con los resultados obtenidos por Barrigón et al., (2013) que utiliza metanol como única fuente de carbono. Se observa que el comportamiento de la cepa con sustratos mixtos glicerol y sorbitol a nivel de rendimiento $Y_{p/x}$ y productividad volumétrica presenta un comportamiento parecido al reportado cuando se utiliza metanol como única fuente de carbono. Los resultados de la velocidad

específica de consumo de metanol son iguales cuando se utiliza metanol como única fuente de carbono y cuando se utiliza sorbitol como cosustrato, lo que muestra que el sorbitol no ejerce acciones represoras sobre el promotor P_{AOX1} , contrario a lo observado cuando se utiliza glicerol como cosustrato donde el consumo de metanol disminuye 2.6 veces; exponiendo que, a pesar de encontrarse en condiciones limitantes el glicerol reprime al promotor P_{AOX1} como ha sido reportado por otros autores (Thorpe et al., 1999; Hellwig et al., 2001; Inan y Meagher, 2001).

Tabla 7.2: Parámetros de producción de cultivos semicontinuos utilizando sustratos mixtos, para la producción de ROL utilizando el fenotipo Mut⁺ y alimentación con metanol.

Variables	Gli- 0.02 h ⁻¹	Sorb- 0.02 h ⁻¹	Barrigón et al., 2013
	Met- 0.02 h ⁻¹ Mut ⁺	Met- 0.02 h ⁻¹ Mut ⁺	Met- 0.02 h ⁻¹ Mut ⁺
Actividad Lipolítica Máx. (U/mL)	124	73	112
Y _{P/X} (U/g)	1573	2307	2130
Productividad volumétrica (U/L·h)	1762	1116	1700
Productividad específica (U/g·h)	22	35	32
q _{s,met} media (g _{met} /g·h)	0.046	0.12	0.12
q _{s,cosust} media (g _{gli} /g·h)	0.021	0.028	---
q _p media (U/g·h)	44	50	46
μ _{media} (h ⁻¹)	0.028	0.015	0.022

Aunque los coeficientes de rendimiento son parámetros importantes para evaluar la eficiencia y la rentabilidad de bioprocesos, debe tenerse en cuenta que para productos comerciales que tienen gran valor en la industria, la cantidad final de producto es crucial. Por tanto, el principal objetivo de este trabajo es aumentar la cantidad final de producto. Sin embargo no fue posible incrementar la cantidad de producto final con la estrategia de utilizar sustratos mixtos. El logro principal es adquirir una herramienta sencilla para trabajar fermentaciones con múltiples variables de interés, la estrategia de sustratos mixtos utilizando una alimentación exponencial preprogramada es un protocolo fácil, rápido, no requiere de manipulación constante de las variables de alimentación ni de un control estricto de la concentración de sustratos en el medio de cultivo.

7.3.2 Cultivo semicontinuo alimentado con sustratos mixtos con una velocidad específica de crecimiento sobre glicerol a 0.04 h^{-1} y metanol a 0.02 h^{-1} .

A diferencia de la cepa Mut^s, la producción máxima expresada en términos de actividad, fue la obtenida utilizando glicerol como cosustrato en la cepa Mut⁺. Se realizó un tercer experimento aumentando el set-point de la velocidad específica de crecimiento con glicerol hasta un valor de 0.04 h^{-1} , con el objetivo de comprobar si con este fenotipo el aumento de la adición exponencial de glicerol afecta la producción de la ROL manteniendo las mismas condiciones para el set-point de metanol.

En la figura 7.2 se observa la evolución de los diferentes parámetros de cultivo en función del tiempo de inducción, bajo las condiciones anteriormente mencionadas. La biomasa se incrementa hasta las 18 h de iniciada la etapa de inducción, después de una breve ralentización del crecimiento de aproximadamente 7 h, la biomasa vuelve a crecer hasta alcanzar un valor máximo de 62.8 g/L (figura 7.2 A). En el cultivo, la μ (0.039 h^{-1}) se mantiene alrededor del set-point de glicerol (figura 7.2 B). Nuevamente no se observa acumulación de los sustratos en el cultivo, siendo ambos consumidos simultáneamente a pesar de tratarse de un fenotipo Mut⁺, al igual que en los experimentos anteriores y como ha sido reportado en la literatura (D'Anjou y Daugulis, 2001). Por lo que respecta a la actividad lipolítica, después del ya conocido periodo de unas 15 horas al inicio de la fase de inducción donde prácticamente se para la producción, la actividad se incrementa de manera gradual hasta alcanzar un valor máximo de 57 U/mL.

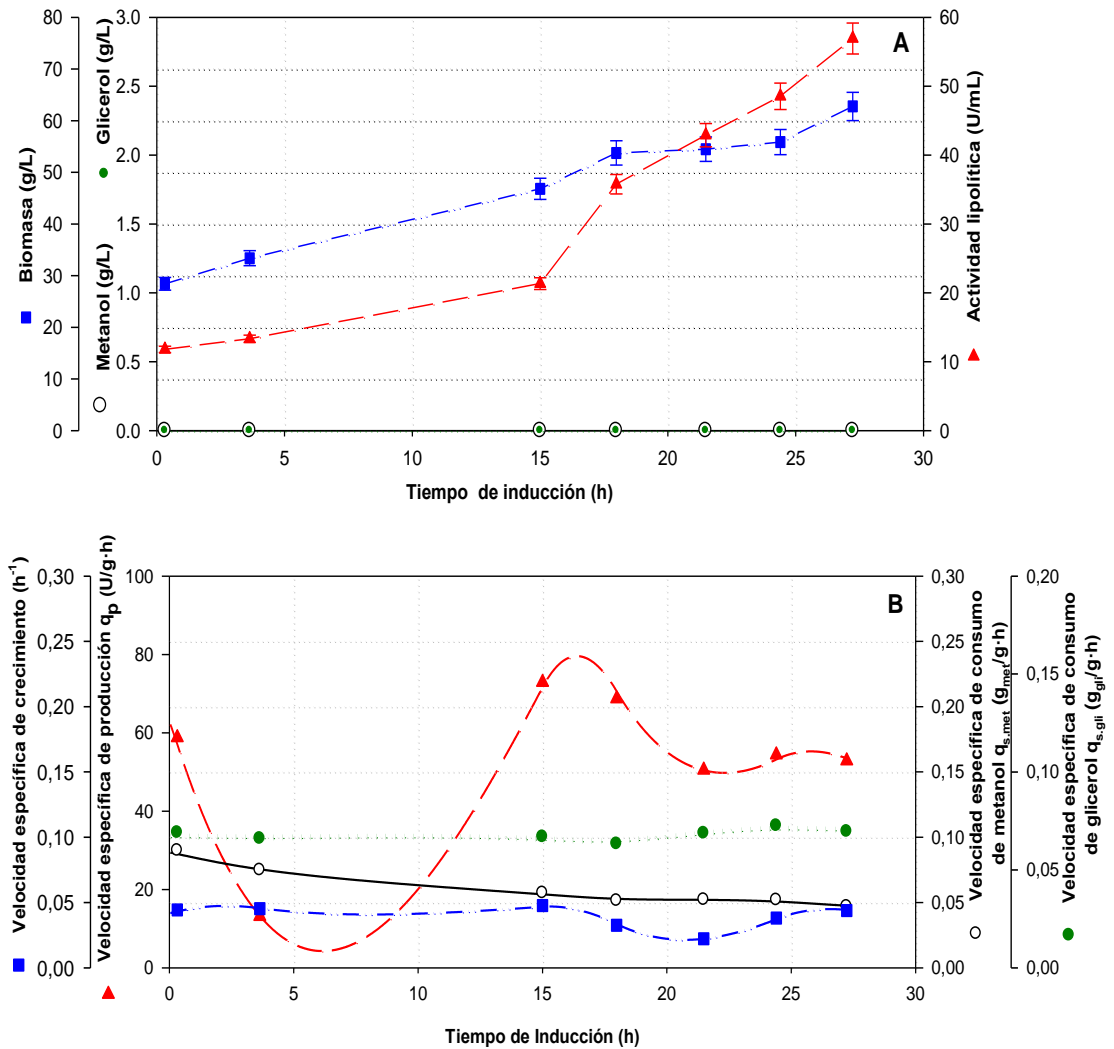


Figura 7.2: Evolución de los diferentes parámetros de cultivo realizando una estrategia de semicontinuo con el fenotipo Mut⁺ utilizando sustratos mixtos manteniendo la μ de metanol a 0.02 h^{-1} y glicerol a 0.04 h^{-1} .

La figura 7.2 B, muestra como la q_s de glicerol durante la etapa de inducción permanece alrededor del valor medio en $0.067 \text{ g}_{gli}/g \cdot h$. La velocidad específica de consumo de metanol en la misma figura se observa que disminuye ligeramente durante la fase de inducción, presentando un valor medio de $0.059 \text{ g}_{met}/g \cdot h$. La q_p en las primeras 10 h de inducción disminuye hasta valores mínimos ($4.3 \text{ U}/g \cdot h$), luego sobre las 17 h presenta el valor máximo de velocidad específica de producción ($79.5 \text{ U}/g \cdot h$) para después de un breve descenso estabilizarse en valores por encima de $50 \text{ U}/g \cdot h$ (figura 7.2 B).

En la tabla 7.3 se comparan las principales variables de las velocidades específicas y las productividades en los cultivos utilizando glicerol como cosustrato a diferentes velocidades específicas de crecimiento. Con respecto a las velocidades

específicas medias se puede observar que las velocidades específicas de crecimiento se ajustan bastante al valor predeterminado. La q_s de glicerol es 2,1 veces superior para la $\mu = 0.04 \text{ h}^{-1}$ en consonancia con haber doblado la velocidad específica de crecimiento asociada a este sustrato. Por lo que respecta a la velocidad específica de consumo de metanol se observa que es inferior para la $\mu = 0.04 \text{ h}^{-1}$, Como no ha habido modificaciones en el caudal de adición preprogramado de metanol entre ambos experimentos parece ser un claro síntoma de que, aunque el metanol no se acumula en el medio de cultivo, bajo estas condiciones se comienza a observar una ligera represión del promotor P_{AOX1} .

Cuando el glicerol es utilizado a una baja μ , la actividad lipolítica máxima registrada durante el cultivo es 2.2 veces superior a la obtenida cuando se incrementa la μ de glicerol, mientras que la q_p media registrada es similar. En la misma tabla se muestra que la velocidad de consumo específico de metanol medio es 1.3 veces mayor cuando se utiliza la μ de glicerol a 0.02 h^{-1} .

Tabla 7.3: Comparación de las velocidades específicas utilizando glicerol a diferente μ (0.02 y 0.04 h^{-1}), manteniendo el metanol a una μ de 0.02 h^{-1} , para la producción de ROL con el fenotipo Mut⁺

Variables	Glicerol 0.04 h^{-1}	Glicerol 0.02 h^{-1}
Actividad Lipolítica Máxima (U/ml)	57	124
q_{sMOH} media ($g_{mev}/g \cdot h$)	0.059	0.076
$q_{sCOSUST}$ media ($g_{COSUST}/g \cdot h$)	0.067	0.032
q_p media (U/g·h)	42	44
μ_{media} (h^{-1})	0.039	0.028
$Y_{P/X}$ (U/g)	907	1573
Productividad Volumétrica (U/L·h)	1102	1762
Productividad Específica (U/g·h)	18	22

Comparando los parámetros de producción de los cultivos utilizando glicerol como cosustrato a dos μ diferentes, se puede observar que se obtienen valores similares en cuanto a la productividad específica, destacando que la productividad volumétrica es 1.6 veces mayor cuando se utiliza la μ de glicerol más baja, al igual que los valores de rendimiento $Y_{P/X}$ siendo 1.7 veces mayor con una μ de glicerol baja. En resumen, el cultivo realizado con glicerol como cosustrato a una velocidad específica de crecimiento de 0.02 h^{-1} presenta valores superiores en cuanto a la productividad volumétrica y al rendimiento $Y_{P/X}$.

Los valores de la velocidad específica de producción, son relativamente similares ya que se compensa la menor producción con el menor tiempo de inducción y una menor concentración de biomasa final alcanzada. Por consiguiente, los mayores valores de los parámetros que maximizan el bioproceso utilizando esta estrategia de sustratos mixtos con un fenotipo Mut⁺ realizando la adición preprogramada de ambos sustratos para la producción de ROL se obtienen utilizando glicerol como cosustrato a una velocidad específica de crecimiento de 0.02 h⁻¹.

Teniendo en cuenta la baja productividad de las estrategias de operación presentadas en este capítulo, se realizó un análisis de actividad proteolítica, para comprobar si la baja actividad lipolítica obtenida con respecto a los experimentos realizados por Arnau et al., (2011) con el fenotipo Mut^s se debe a la degradación proteolítica por la presencia de proteasas en el medio de cultivo. La figura 7.3 muestra la concentración de proteasas detectada en diferentes etapas del cultivo para las tres fermentaciones realizadas. Al utilizar glicerol y metanol como cosustratos se observa un aumento significativo de la actividad proteolítica independientemente de la velocidad específica de crecimiento sobre glicerol, cosa que no ocurre cuando se utilizó sorbitol como cosustrato. Este resultado está en concordancia con los reportados por Arnau et al., (2011), donde se describe que al utilizar sorbitol en una cepa Mut^s la presencia de proteasas hacia el final del cultivo presenta niveles muy bajos.

En general, la degradación proteolítica de proteínas recombinantes secretadas, puede ser causada por proteasas extracelulares en el medio de cultivo, proteasas unidas a células o proteasas intracelulares liberadas por procesos de lisis celular (Wang et al., 2010). En *P. pastoris* las proteasas no han sido bien caracterizadas, aunque han habido varios reportes de degradación proteolítica de proteínas recombinantes producidas en *P. pastoris*, como fue descrito por Sinha et al., (2003) encontrando que la presencia de proteasas es menor al trabajar con una baja velocidad específica de crecimiento con metanol. Se han sugerido como medio para evitar la degradación proteolítica de la proteína recombinante diversas estrategias como la adición de casaminoácidos, adición de inhibidores de proteasas o el uso de cepas deficientes de proteasas (Sinha et al., 2005). Hasta el momento, no existe un análisis en profundidad de las condiciones que promueven la proteólisis o la naturaleza de las proteasas actuantes sobre la proteína de interés.

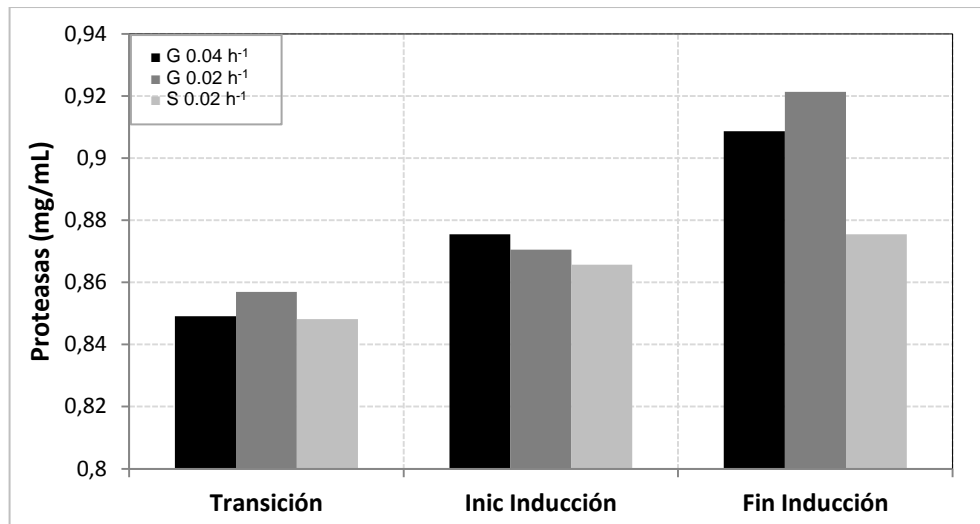


Figura 7.3: Actividad proteolítica realizada en diferentes puntos del bioproceso, en cultivos utilizando sustratos mixtos con una μ de 0.02 h^{-1} de metanol y una μ de cosustrato a: ■ glicerol a 0.04 h^{-1} , ■ glicerol a 0.02 h^{-1} , ■ sorbitol 0.02 h^{-1} .

Al utilizar el sorbitol se observa que la acumulación de proteasas en el medio durante la etapa de inducción no es significativa confirmando los resultados reportados por Arnau et al., (2011) en un estudio realizado con el fenotipo Mut^s la presencia de proteasas en el medio con sorbitol como cosustrato fue muy baja. Se observa que la μ de glicerol de 0.02 h^{-1} presenta una mayor cantidad de proteasas en el medio extracelular contrario a lo reportado por Arnau et al., (2011) que al incrementar la μ de trabajo con glicerol incrementa la concentración de proteasas al final del cultivo.

Al determinar la pureza de la proteína recombinante en términos de actividad con respecto a la cantidad de proteína en el medio de cultivo, en la figura 7.4 se puede observar que las muestras obtenidas cuando se utilizó el sorbitol como cosustrato presentan mayor valor de actividad específica, el menor valor obtenido fue al utilizar glicerol a una μ de 0.04 h^{-1} . En la figura se observa que al utilizar esta μ de glicerol se presentan valores ascendentes de actividad específica hasta las 25 h de inducción, luego se aprecia un gran descenso en los valores, lo que podría estar relacionado con la presencia de un mayor número de contaminantes en el medio de cultivo por la excreción de proteasas u otras proteínas como producto del incremento de la actividad metabólica. En relación a las muestras obtenidas en el ensayo con glicerol a una μ de 0.02 h^{-1} , al igual que en el ensayo anterior hay un incremento de la actividad lipolítica hasta las 25 h de inducción para luego estabilizarse en un valor mayor que al utilizar glicerol a una μ más alta. De otro lado, los niveles de biomasa alcanzados en los cultivos con glicerol como cosustrato son

mayores que los alcanzados con sorbitol, por lo que puede ser que haya un mayor efecto de lisis celular en los cultivos con glicerol de forma que se recuperan más contaminantes en el producto final, sobre todo en etapas avanzadas del cultivo.

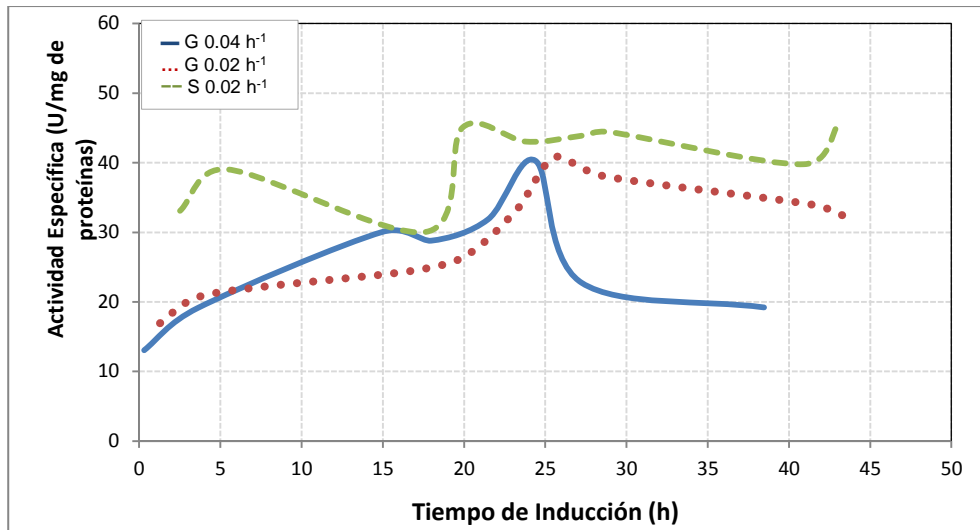


Figura 7.4: Actividad lipolítica específica en cultivos semicontinuos con sustratos mixtos con una μ de 0.02 h^{-1} de metanol: — glicerol a 0.04 h^{-1} , ... glicerol a 0.02 h^{-1} , - - - sorbitol 0.02 h^{-1} .

7.4 Conclusiones

En este capítulo se ha aplicado la estrategia en semicontinuo controlando aproximadamente la velocidad específica de consumo de sustratos mixtos glicerol o sorbitol y metanol mediante una adición exponencial preprogramada. Con el objetivo de comprobar las prestaciones de una estrategia de operación en fed-batch mucho más fácil de implementar que la de tener que disponer de un control en línea de metanol.

La estrategia de sustratos mixtos, utilizando como cosustrato glicerol alcanza valores 1.7 veces superiores de actividad lipolítica máxima, en comparación con trabajar con sorbitol como cosustrato en las mismas concentraciones de trabajo con el fenotipo Mut⁺ de *P. pastoris* en experimentos en semicontinuo. Sin embargo en términos de productividad específica, el cultivo de sustratos mixtos realizado sobre sorbitol y metanol es más alto que cuando se utilizó glicerol como cosustrato en una cepa de *P. pastoris* con fenotipo Mut⁺.

En cepas de *P. pastoris* de fenotipo Mut⁺ se observó una clara disminución en el rendimiento $Y_{P/X}$ y en la productividad volumétrica al incrementarse la velocidad específica de crecimiento del glicerol en sustratos mixtos glicerol-metanol.

La presencia de proteasas en el medio de cultivo fue mayor al utilizar glicerol como cosustrato, ocasionando probablemente la disminución de la actividad específica y afectando los parámetros de productividad del bioproceso.

Para la producción de ROL en cepas de fenotipo Mut⁺ la utilización de glicerol como sustrato mixto no mejoran las producciones y productividades alcanzadas utilizando metanol como única fuente de carbono con control de la concentración del mismo. Por este motivo para esta proteína concreta la utilización de glicerol como subproducto de la producción de biodiesel no es una opción competitiva para la fase de inducción pero sí para la generación previa de biomasa.

7.5 Bibliografía

- Arnau, C., Ramon, R., Casas, C., y Valero, F. (2010). Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(6), 494–500.
- Arnau, C., Casas, C., y Valero, F. (2011). The effect of glycerol mixed substrate on the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system. *Biochemical Engineering Journal*, 57, 30–37.
- Barrigón, J. M., Montesinos, J. L., y Valero, F. (2013). Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut⁺ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures? *Biochemical Engineering Journal*, 75, 47–54.
- Celik, E., Calik, P., Oliver, S. G., Çelik, E., y Calik, P. (2009). Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. *Yeast*, 26, 473–484.
- Chenikher, S., Guez, J. S., Coutte, F., Pekpe, M., Jacques, P., y Cassar, J. P. (2010). Control of the specific growth rate of *Bacillus subtilis* for the production of biosurfactant lipopeptides in bioreactors with foam overflow. *Process Biochemistry*, 45(11), 1800–7.
- Cos, O., Resina, D., Ferrer, P., Montesinos, J. L., y Valero, F. (2005a). Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 26(2-3), 86–94.
- Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J. L., Ferrer, P., Cregg, J. M., y Valero, F. (2005b). combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 116, 321–335.
- Cos, O., Ramon, R., Montesinos, L., y Valero, F. (2006). A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(1), 145–154.
- D'Anjou, M. C., y Daugulis, A. J. (2001). A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(1), 1–11.
- Hellwig, S., Emde, F., Raven, N. P., Henke, M., Van Der Logt, P., y Fischer, R. (2001). Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using *on-line* methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 74(4), 344–52.
- Inan, M., y Meagher, M. M. (2001). Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(6), 585–9.
- Jungo, C., Marison, I., y Von Stockar, U. (2007a). Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *Journal of Biotechnology*, 128(4), 824–37.

- Jungo, C., Schenk, J., Pasquier, M., Marison, I. W., y Von Stockar, U. (2007b). A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 131(1), 57–66.
- Katakura, Y., Zhang, W., Zhuang, G., Omasa, T., Kishimoto, M., Goto, Y., y Suga, K. I. (1998). Effect of methanol concentration on the production of human Pz-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(5), 482–487.
- McGrew, J. T., Leiske, D., Dell, B., Klinker, R., Krasts, D., Wee, S. F., y Harrington, K. (1997). Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants. *Gene*, 187(2), 193–200.
- Potvin, G., Ahmad, A., y Zhang, Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 91–105.
- Ramón, R., Ferrer, P., y Valero, F. (2007). Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 130(1), 39–46.
- Salehmin, M. N. I., Annuar, M. S. M., y Chisti, Y. (2013). High cell density fed-batch fermentations for lipase production: feeding strategies and oxygen transfer. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(11), 1527–43.
- Shojaosadati, S. A., Marjan, S., Kolaei, V., Babaeipour, V., y Farnoud, A. M. (2008). Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Irian Journal of Biotechnology*, 6(2), 63–84.
- Sinha, J., Plantz, B. A, Zhang, W., Gouthro, M., Schlegel, V., Liu, C. P., y Meagher, M. M. (2003). Improved production of recombinant ovine interferon- τ by Mut(+) strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile. *Biotechnology Progress*, 19(3), 794–802.
- Sinha, J., Plantz, B. a, Inan, M., y Meagher, M. M. (2005). Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(1), 102–12.
- Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J. T., Smith, P. L., y Birkenberger, L. a. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 190(1), 55–62.
- Thorpe, E. D., Anjou, M. C., y Daugulis, A. J. (1999). Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 21, 669–672.
- Wang, Z., Wang, Y., Zhang, D., Li, J., Hua, Z., Du, G., y Chen, J. (2010). Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonate lyase production by sorbitol co-feeding with methanol in *Pichia pastoris* fermentation. *Bioresource Technology*, 101(4), 1318–23.
- Xie, J., Zhou, Q., Du, P., Gan, R., y Ye, Q. (2005). Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2-3), 210–216.

- Zhang, W., Bevins, M. A., Plantz, B. A., Smith, L. A., y Meagher, M. M. (2000). Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of Botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(1), 1–8.
- Zhang, W., Hywood Potter, K. J., Plantz, B. A., Schlegel, V. L., Smith, L. A., y Meagher, M. M. (2003). *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*, 30(4), 210–5.

Capítulo 8

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo, relacionados con la expresión recombinante de una lipasa de *R. oryzae* en la levadura *P. pastoris*, utilizando una estrategia de alimentación con sustratos mixtos (metanol-glicerol) en la etapa de inducción en cultivos semicontinuos, permiten alcanzar las siguientes conclusiones generales:

La valorización de glicerol crudo proveniente de la producción de biodiesel para el crecimiento de *P. pastoris* es posible, no observándose diferencias significativas en términos de rendimiento biomasa/sustrato, y velocidad específica de crecimiento, de consumo de metanol y de producción de la rROL en cultivos semicontinuos utilizando metanol como única fuente de carbono en la etapa de inducción. Este hecho permitiría su utilización en esta factoría celular, haciendo posible la reducción de los costes en la producción del biodiesel, aumentando la sostenibilidad medioambiental y económica de la industria del biodiesel.

La implementación de una estrategia de operación simple basada en una alimentación exponencial preprogramada de glicerol para mantener una velocidad específica de crecimiento constante sobre este sustrato y pulsos de metanol a diferente frecuencia y concentración permitió concluir que trabajando con una alimentación con pulsos de metanol como única fuente de carbono, hay una clara disminución de la producción de la proteína heteróloga. Esto es consecuencia de la escasez de fuente de carbono durante un tiempo prolongado, observándose actividad proteolítica al trabajar a velocidades específicas de crecimiento altas.

Por otro lado, se observó que la concentración y frecuencia de adición de los pulsos de metanol afectan a la producción de la proteína heteróloga. Sin embargo, el rendimiento producto-biomasa no se ve afectado por la cantidad de metanol adicionado y frecuencia de adición, así como por la velocidad específica de crecimiento con glicerol.

La estrategia de utilizar sustratos mixtos en semicontinuo para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* con una aplicación de pulsos de metanol, si bien es una estrategia operacional mucho más simple, no se ha acercado a la productividad del bioproceso obtenida cuando se controla la concentración de metanol en el medio.

La implementación de una estrategia de operación utilizando sustratos mixtos manteniendo una concentración de metanol constante en el medio de fermentación y una velocidad específica de crecimiento preprogramada utilizando glicerol como cosustrato no mejoraron las prestaciones conseguidas en la producción de rROL cuando se compararon con cultivos de fenotipo Mut^s utilizando la misma estrategia y fenotipo Mut⁺ utilizando metanol como única fuente de carbono.

La concentración de proteasas aumentó al aumentar la velocidad específica de crecimiento del glicerol, sobre todo en la parte final del cultivo, afectando directamente a la pureza del producto final, siendo necesario trabajar a velocidades específicas de crecimiento sobre glicerol bajas para limitar este efecto.

La implementación de una estrategia de alimentación utilizando sustratos mixtos (glicerol-metanol, sorbitol-metanol) mediante una adición exponencial preprogramada de cada sustrato alimentados de forma independiente en el medio de cultivo durante el bioproceso, trabajando siempre en condiciones limitadas para ambos sustratos, permitió concluir que la estrategia de sustratos mixtos, utilizando como cosustrato glicerol alcanza valores 1.7 veces superiores de actividad lipolítica máxima, en comparación con trabajar con sorbitol como cosustrato en las mismas concentraciones de trabajo con el fenotipo Mut⁺ de *P. pastoris* en experimentos en semicontinuo. Sin embargo, en términos de productividad específica, el cultivo de sustratos mixtos realizado sobre sorbitol y metanol es más alta que cuando se utilizó glicerol como cosustrato en una cepa de *P. pastoris* con fenotipo Mut⁺.

En cepas de *P. pastoris* de fenotipo Mut⁺ se observó una clara disminución en el rendimiento $Y_{P/X}$ y en la productividad volumétrica al incrementarse la velocidad específica de crecimiento del glicerol en la operación con sustratos mixtos glicerol-metanol.

La presencia de proteasas en el medio de cultivo fue mayor al utilizar glicerol como cosustrato, ocasionando probablemente la disminución de la actividad específica y afectando los parámetros de productividad del bioproceso.

Para la producción de ROL en cepas de fenotipo Mut⁺ la utilización de glicerol como sustrato mixto no mejora los rendimientos y productividades alcanzadas utilizando metanol como única fuente de carbono con control de la concentración del mismo. Por este motivo, para esta proteína concreta la utilización de glicerol subproducto de la producción de biodiesel no es una opción competitiva para la fase de inducción pero sí para la generación previa de biomasa.

Se han abierto recientemente diversas líneas de investigación en *P. pastoris* para potenciar la secreción de proteínas recombinantes. Una de estas vías es la obtención de cepas modificadas respecto a la actividad o el nivel de expresión de determinadas enzimas celulares. Algunos de estos ejemplos proporcionarían una nueva línea interesante a estudiar con el objeto de proceder a una optimización global del proceso, pero en este caso, a través de herramientas moleculares.

Capítulo 9

ANEXOS

Anexo 1: Curva de calibrado de la sonda de metanol

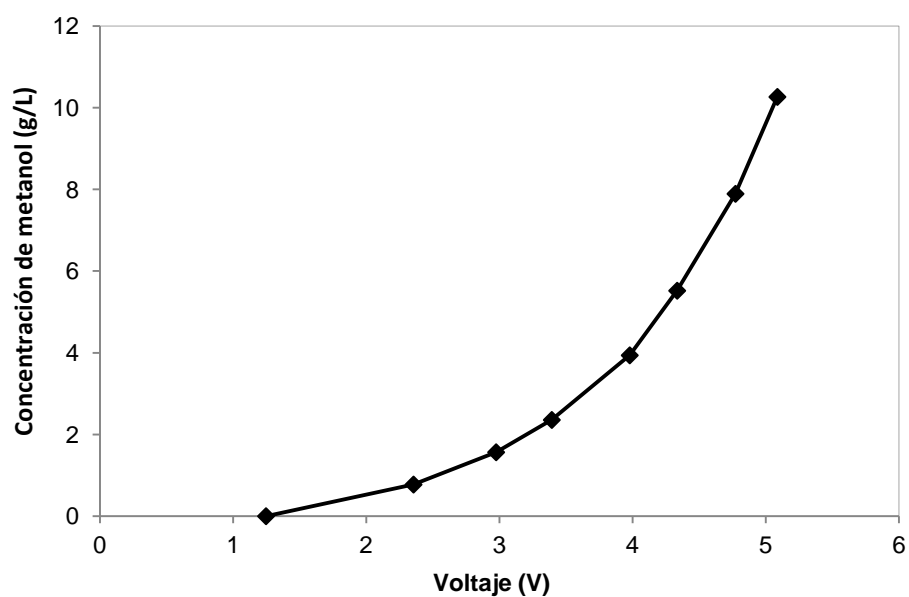


Figura 9.1 Curva de calibrado de la Sonda de metanol

$$y_0 = -0.219$$

$$a = 0.088$$

$$b = 0.812$$

$$r^2 = 0.999$$

$$M = y_0 + a \cdot e^{b \cdot V} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Resultados obtenidos después de realizar la calibración de la sonda Raven Biotech. El calibrado se realiza en las condiciones de operación sin biomasa. Los puntos experimentales se han ajustado a la ecuación 9.1.

Anexo 2: Recta de calibrado de la concentración de biomasa total

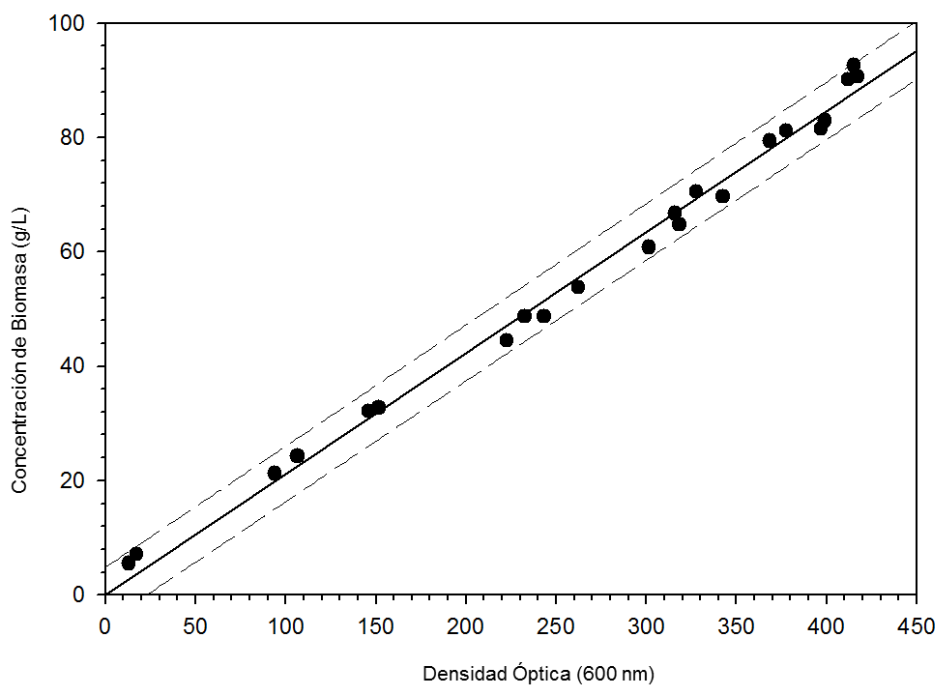


Figura 9.2 Recta de calibrado de la concentración de biomasa respecto a la densidad óptica equivalente

$$\text{Concentración de biomasa (g/L)} = 0.212 (\pm 0.004) \cdot \text{OD}_{600}$$

$$r^2 = 0.992$$

Intervalo de Confianza del 95 %

Anexo 3: Recta de calibrado de la actividad lipolítica

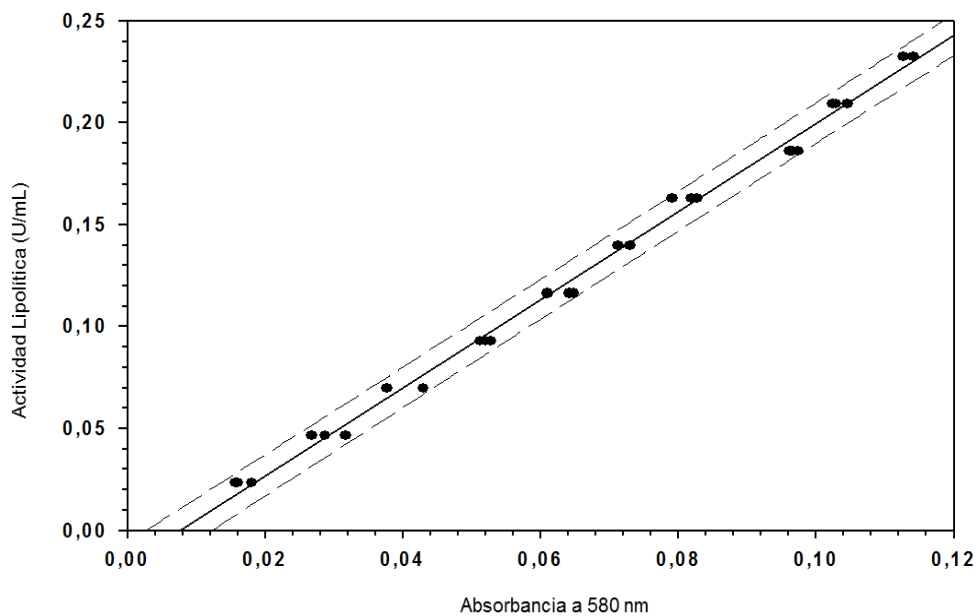


Figura 9.3 Recta de calibrado de la actividad lipolítica extracelular

Actividad Lipolítica (U/mL): $2.162(\pm 0.029) \cdot \text{pendiente} (\text{min}^{-1}) - 0.016(\pm 0.002)$

r^2 : 0.995.

Rango de medida de la pendiente entre 0.016 y 0.113/min

Intervalo de confianza 95%

Anexo 4: Recta de calibrado de la concentración de proteínas totales

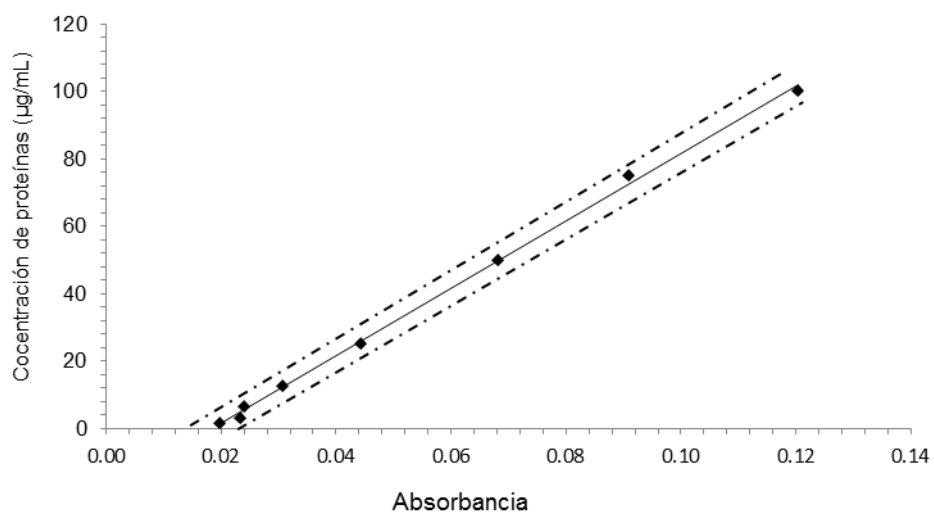


Figura 9.4 Recta de calibrado de la concentración de proteínas

Concentración de proteína total: $0.001x + 0.0186 (\pm 0.0015)$

r^2 : 0.998

Intervalo de confianza 95 %