



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

ESCOLA D'ENGINYERIA

Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental

Combining bioprocess and strain engineering strategies as
efficient tools for the optimization of recombinant protein
production in *Pichia pastoris*

Memoria para optar al Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona
dentro del Programa de Doctorado en Biotecnología, bajo la dirección de los doctores:

Francisco Valero Barranco, José Luis Montesinos Seguí y Xavier Garcia Ortega

Miguel Angel Nieto-Taype

Bellaterra, 2020

Title: Combining bioprocess and strain engineering strategies as efficient tools for the optimization of recombinant protein production in *Pichia pastoris*
Author: Miguel Angel Nieto-Taype
Supervisors: Francisco Valero Barranco, José Luis Montesinos Seguí, Xavier Garcia Ortega.
Keywords: *Pichia pastoris*, bioprocess engineering, strain engineering, *GAP* promoter, *AOXI* promoter, engineered promoters.

PhD in Biotechnology
Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental
Escola d' Enginyeria
Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra March 2020.

This work was funded by MINECO and FEDER under project CTQ2016-74959-R and the PhD grant from the National Council of Science, Technology and Technological Innovation (CONCYTEC) through its executing unit, the National Fund for Scientific, Technological and Technological Innovation Development (FONDECYT).

Francisco Valero Barranco, Catedrático, José Luis Montesinos Seguí, Profesor Titular, miembros del Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental de la Universidad Autónoma de Barcelona y Xavier Garcia Ortega, Profesor Agregado del Departamento de Biociencias de la Universidad de Vic – Universidad Central de Cataluña

CERTIFICAMOS:

Que el biólogo Miguel Angel Nieto-Taype, ha realizado, bajo nuestra dirección, en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental de la Universidad Autónoma de Barcelona, el trabajo con el título: “Combining bioprocess and strain engineering strategies as efficient tools for the optimization of recombinant protein production in *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 dentro del programa de doctorado de Biotecnología.

Y para dejar constancia y que tenga los efectos que corresponda, firmamos la presente en Bellaterra, 17 de marzo de 2020

Dr. Francisco Valero Barranco

Dr. José Luis Montesinos Seguí

Dr. Xavier Garcia Ortega

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a Dios por guiar siempre mis pasos y por darme tantas bendiciones en esta vida ser mi fortaleza en todo momento.

Agradecer a mis tutores: Al Doctor Francisco Valero Barranco, José Luis Montesinos Seguí y Xavier García Ortega por ser mis mentores durante este proceso de formación. Muchas gracias por permitirme formar parte del grupo de Lipasas y todo el apoyo que siempre me habéis dado. Gracias Paco por siempre estar al tanto de mi avance y apoyarme en todo momento. Gracias José Luis por siempre estar siempre dispuesto a solventar mis dudas y discutir los resultados. Gracias Xavi por el soporte y la paciencia ofrecidos durante el inicio de la tesis al enseñarme a utilizar los fermentadores y los consejos dados a lo largo de la tesis tanto a nivel académico como personal.

Agradecer al Prof. Anton Glieder por darme la gran oportunidad de trabajar en su equipo de investigación en la Graz University of Technology (TU Graz) durante la estancia realizada, en la adquirí nuevas habilidades que complementaron mi formación. Además, me permitió conocer personas maravillosas como Nico, Christian, Stefan, Tobias, Corinna.

Agradecer a la Dra. Angels Manresa Presas por mostrarme siempre su apoyo y soporte incondicional desde que realicé el trabajo de máster en su grupo de investigación y enseñarme a ser siempre perseverante a pesar de las adversidades.

Agradecer a la gente del grupo de Lipasas y Aldolasas: A Javier (JGM) por compartir conmigo muchas travesías durante este periodo como el RNA (la receta), las visitas a Can Salva, los continuos interminables y la qPCR (segunda receta). A Juanjo (JBP), Sergi (SMM), Arnau, Albert, Josu y Miquel por compartir también muchos momentos y siempre haberme ofrecido su apoyo sincero. Muchas gracias, Marc por haber formado parte de esta tesis durante tu TFM a pesar de tu “que no cobro”, y por estar presente luego como un gran amigo. De igual forma agradecer a Ramón y Laia por formar parte de este trabajo y luego volverse grandes amigos.

En lo personal agradecer a mis padres Miguel y María gracias a quienes soy lo que soy y haberme dado todo su afecto y apoyo en esta etapa. A mi hermana Brenda porque siempre estaremos para apoyarnos.

A mi amada esposa Erika quien me ha dado el soporte para poder superar todas las adversidades y a quien admiro y agradezco por todo lo que haces cada día. Muchas gracias por tu paciencia y por darme tanta alegría a mi vida. Finalmente, a mi pequeña Astrid Luciana quien ha llegado para darme un motivo más por el cual superarme ya no solo como hijo, como esposo, como amigo e investigador sino ahora como padre.

Summary

Microbial cell factories can be used to produce a wide range of bioproducts of interest for the biotechnological industry, which comprises mainly the production of recombinant proteins and metabolites. *Pichia pastoris* (*Komagataela phaffii*), emerges as a promising host for recombinant protein production (RPP) due to it shares many features with *Saccharomyces cerevisiae*, however, displays some advantages in terms of oxygen consumption, simpler glycosylation pattern, and lower endogenous protein secretion. For these reasons, great efforts have been performed with the objective to optimize the efficiency of this host which can be grouped in two main and complementary approaches: the strain and bioprocess engineering. The present PhD thesis was focused in the use of both approaches, in order to improve the production bioprocess of recombinant lipases with industrial interest.

At first, it was demonstrated the importance of the knowledge of production kinetics as strong tool to design optimal strategies for RPP. Thus, the bioprocess characterization of two clones expressing *Candida rugosa* lipase 1 (Cr11), with contrasting production performance due to its different gene dosage (single-copy clone, SCC and multi-copy clone, MCC) regulated under *GAP* promoter, was evaluated by using chemostat cultures. The study showed higher values in production parameters on MCC against SCC with different trends on production kinetics behaviour according to the clone used. These results were also supported by transcriptional analysis of some target genes, which represents a novelty respect to previous studies carried out by the research group. Later, fed-batch cultures at different specific growth rates confirmed the findings previously obtained. It was demonstrated that production kinetics depends on the intrinsic characteristics of each clone used. Therefore, the selection of adequate μ for each case enables, in a different way, the rational process development to optimize RPP bioprocesses.

On the other hand, following the bioprocess engineering approach, it has been also observed that cellular stress can trigger an increase in product synthesis. It was studied the implementation of carbon-starving as a new bioprocess strategy in fed-batch cultures, which has demonstrated positive effects on production rates and yields. Before the implementation in fed-batch bioprocess, chemostat cultures were performed to

characterize the effect of carbon-starving period time. No effect was observed in SCC; however, an increase on production parameters was observed for the MCC. An additional transcriptomic analysis (RNAseq) was carried out with chemostat samples, pointing out the difference on the transcription of all the genes of the yeast. When the operational mode was the fed-batch, similar results were obtained.

Once the constitutive production based on the *GAP* promoter (P_{GAP}) was studied, the bioprocess performance was also compared with the inducible *AOXI* promoter (P_{AOXI}) using SCC and MCC clones in chemostat cultures producing Cr11. Although P_{AOXI} displayed higher production efficiency than P_{GAP} , an economical evaluation should be necessary before scale-up of the bioprocess, considering the numerous drawbacks of using methanol as substrate.

Finally, besides the classical P_{GAP} and P_{AOXI} , the use of methanol-free novel promoters arises as a strong tool from the strain engineering approach to exploit *P. pastoris* potential on RPP. Thus, alternative promoters provided by Prof. Anton Glieder were evaluated on *P. pastoris* clones expressing the lipase B from *Candida antarctica*. The methodology used during the clone generation including screening on deep well plates (DWP's) was described in detail. Then, these promoters were further studied on shake flask and chemostat cultures to get insights about possible regulation mechanisms and the behaviour of specific production rate at different specific growth rates. Both novel promoters showed much better production parameters in contrast to *GAP* promoter, although the production pattern between promoters were significantly different.

Overall, the results presented along the different chapters of this current thesis support the usefulness of bioprocess and strain engineering through the different studies performed, which gave significant improvements in RPP efficiency. The knowledge of key factors involved on recombinant expression opens a window of new opportunities that allows *P. pastoris* to be established as a robust platform for RPP and showing it as highly competitive to conventional systems.

Resumen

Las factorías celulares microbianas pueden ser utilizadas para producir un amplio rango de bioproductos de interés para la biotecnología industrial, los cuales comprenden principalmente la producción de proteínas recombinantes y metabolitos. *Pichia pastoris* (*Komagataela phaffii*), emerge como un hospedero prometedor para la producción de proteína recombinante (RPP) debido a que comparte muchas características con *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, muestra ventajas en relación con el consumo de oxígeno, tener un patrón de glicosilación más simple, y una menor secreción de proteínas endógenas. Por estas razones, se han sido realizado grandes esfuerzos con el objetivo de optimizar la eficiencia de este hospedero, las cuales pueden agruparse en dos principales y complementarios enfoques: la ingeniería de cepas y de bioprocesos. La presente tesis doctoral se basó en el uso de ambos enfoques para mejorar bioprocesos de producción de lipasas recombinantes de interés industrial.

En primer lugar, se demostró la importancia del conocimiento de las cinéticas de producción como una herramienta sólida para el diseño de estrategias óptimas en la RPP. Así, se caracterizó el bioproceso de dos clones que expresan la lipasa 1 de *Candida rugosa* (Cr11) con diferente comportamiento en la producción debido a la distinta dosis génica (clon monocopia, SCC y clon multicopia, MCC), los cuales estaban regulados bajo el promotor *GAP*, utilizando cultivos en quimiostato. El estudio mostró mayores valores en los parámetros de producción en el MCC frente al SCC, con una tendencia diferente respecto a las cinéticas de producción según el clon utilizado. Estos resultados fueron reforzados mediante el análisis transcripcional de genes específicos, lo cual representa una novedad respecto a estudios llevados a cabo previamente dentro del grupo de investigación. Después, varios cultivos en *fed-batch* a diferentes velocidades específicas de crecimiento dieron robustez a los hallazgos obtenidos previamente. De este modo, se pudo demostrar que las cinéticas de producción son altamente dependientes de las características intrínsecas del clon utilizado. Por lo tanto, la selección de una adecuada μ para cada caso permitirá, de manera diferencial, el diseño racional del proceso que permita la optimización de bioprocesos dedicados a la RPP.

Por otro lado, siguiendo el enfoque de la ingeniería de bioprocesos, también se ha observado que el estrés celular puede producir un incremento en la síntesis de productos.

De este modo, fue estudiada la implementación de la privación de carbono (*carbon-starving*) como una novedosa estrategia de bioproceso en cultivos en *fed-batch*, la cual ha demostrado efectos beneficiosos en las velocidades y rendimientos relacionados con la formación de producto. Para ello, previamente a la implementación en bioprosos en *fed-batch* se llevaron a cabo cultivos en continuo (quimiostato) para caracterizar el efecto del tiempo de aplicación del *carbon-starving*. No se observaron efectos en el SCC, sin embargo, se observó un incremento en los parámetros de producción para el MCC. Además, se llevó a cabo el análisis del transcriptoma (RNAseq) con muestras de cultivo en continuo, destacándose la diferencia en la transcripción de algunos de los genes de la levadura. Cuando se aplicó el modo de operación en *fed-batch*, se obtuvieron resultados similares.

Una vez caracterizada la producción constitutiva basada en el uso del promotor *GAP* (P_{GAP}), se comparó su desempeño con el del promotor inducible *AOXI* (P_{AOXI}) utilizando clones SCC y MCC productores de CrI1 en cultivos en quimiostato. Aunque el P_{AOXI} mostró una mayor eficiencia en comparación al P_{GAP} , se hace necesaria una evaluación económica previa al escalado del bioproceso, considerando las limitaciones del uso de metanol como sustrato.

Finalmente, además del uso del P_{GAP} y P_{AOXI} , el uso de nuevos promotores independientes de metanol surge como una poderosa herramienta proveniente del enfoque de la ingeniería de cepas que permiten explotar el potencial de *P. pastoris* para la RPP. Así, se evaluaron promotores alternativos en clones de *P. pastoris* proporcionados por el Prof. Anton Glieder, los cuales expresaban la lipasa B de *Candida antarctica*. La metodología utilizada durante la obtención de clones que incluye el proceso de *screening* en *deep well plates* (DWP's) fue descrito en detalle. Después, dichos promotores fueron estudiados en cultivos en matraz y quimiostato para obtener información sobre el posible mecanismo de regulación y el comportamiento de la velocidad específica de producción a diferentes velocidades específicas de crecimiento. Ambos promotores mostraron parámetros de producción mucho mejores en contraste con el promotor *GAP*, aunque el patrón de producción entre promotores fue significativamente diferente.

En general, los resultados mostrados a lo largo de los diferentes capítulos de la presente tesis doctoral refuerzan la utilidad de la ingeniería de bioprosos y de cepas a través de los diferentes estudios realizados, los cuales permitieron obtener mejoras significativas en la RPP. El conocimiento de los factores clave involucrados en la

expresión recombinante abre una amplia ventana de nuevas oportunidades que permiten que *P. pastoris* se establezca como una plataforma robusta para RPP, mostrándose altamente competitiva frente a los sistemas convencionales.

Tabla de contenidos

Agradecimientos	I
Summary	III
Resumen	V
Tabla de contenidos.....	IX
1 Introducción.....	1
1.1 Producción de proteínas recombinantes y el uso de levaduras como factorías celulares	2
1.2 <i>Pichia pastoris</i> , una levadura no convencional emergente	4
1.3 Estrategias para a un desarrollo integrado de <i>P. pastoris</i> como plataforma de expresión	7
1.4 El reto de los cuellos de botella en la producción de proteínas recombinantes (RPP) 15	
1.5 Tecnología de bioproceso aplicada en el cultivo de <i>Pichia pastoris</i>	19
1.6 Las lipasas como herramientas de aplicación biotecnológica	29
1.7 Referencias.....	38
2 Objectives.....	51
3 Materiales y métodos	53
3.1 Construcción de plásmidos y generación de cepas	54
3.2 <i>Screening</i> de los transformantes productores de Cr11	55
3.3 <i>Screening</i> de los transformantes productores de CalB	55
3.4 Determinación del número de copias	56
3.5 Análisis transcripcional de los clones que expresan <i>CRL1</i> en cultivos en quimiostato	57
3.6 Análisis transcripcional a través de la secuenciación del transcriptoma (RNAseq) durante el estudio del efecto de la privación de carbono (<i>carbon-starving</i>) en cultivos en quimiostato.....	58
3.7 Análisis transcripcional de cultivos en <i>shake flask</i> para los clones que expresan la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> (<i>CalB</i>)	59
3.8 Cultivo en matraz (<i>shake flask</i>) para llevar a cabo el estudio sobre clones productores de CalB.....	60
3.9 Métodos de cultivo en biorreactor	61
3.10 Métodos analíticos.....	62
3.11 Ensayo de actividad lipolítica	63
3.12 Parámetros de proceso.....	64
3.13 Referencias.....	65
4 Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in <i>Komagataella phaffii</i> (<i>Pichia pastoris</i>)	67
4.1 Summary	68

4.2	Introduction	68
4.3	Results and discussion.....	71
4.4	References	85
5	Aplicación de la privación de la fuente de carbono (<i>carbon-starving</i>) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i>	91
5.1	Introducción	92
5.2	Resultados y discusión	95
5.3	Referencias.....	107
6	Comparación de los promotores <i>GAP</i> y <i>AOXI</i> durante la expresión de proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i>	111
6.1	Introducción	112
6.2	Resultados y discusión	115
6.3	Referencias.....	129
7	El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular <i>Pichia pastoris</i>	135
7.1	Introducción	136
7.2	Resultados y discusión	139
7.3	Referencias.....	150
8	Conclusions	155

1 Introducción

1.1 Producción de proteínas recombinantes y el uso de levaduras como factorías celulares

De entre las diferentes ramas de la industria biotecnológica, la relacionada con la obtención de bioproductos microbianos se ha visto incrementada durante los últimos años, suponiendo inversiones de \$143.5 mil millones, con previsiones al alza hasta el 2020 según fuente del *Business Communication Company* (BCC) (Singh *et al.*, 2017). Estos bioproductos pueden ser agrupados en 2 clases: los correspondientes a la producción de proteínas recombinantes (*Recombinant protein production*, RPP) y la obtención de metabolitos (Porro *et al.*, 2011). Estos últimos pueden estar vinculados al crecimiento celular (primarios) como aminoácidos, nucleótidos, ácidos orgánicos, etc.; o no estar asociados al crecimiento, desarrollo y reproducción como antibióticos, toxinas, aromas (secundarios) (Singh *et al.*, 2017).

En la actualidad, la obtención de proteínas recombinantes cuenta con importantes aplicaciones en diferentes áreas de la industria como la de detergentes, papelera, química, cosmética, y farmacéutica. En esta última, desde la aprobación de la producción recombinante de la insulina en 1982 por parte de la FDA (*Food and drug administration USA*) (Huang *et al.*, 2014), a la actualidad más de 400 productos se encuentran en este momento disponibles en el mercado y aproximadamente más de 1300 bajo pruebas clínicas (Sanchez-Garcia *et al.*, 2016; Vieira Gomes *et al.*, 2018).

En este contexto de mercado, se han propuesto diferentes factorías celulares para la producción de proteínas recombinantes, que van desde microorganismos bacterianos hasta animales transgénicos. Sin embargo, sólo unos pocos como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, y células CHO (*Chinese hamster ovary*) han sido ampliamente utilizados para la obtención de un amplio espectro de productos que incluyen los farmacéuticos (Maccani *et al.*, 2014). En el mismo sentido, Houdebine (2009) realizó una comparación entre diferentes hospederos utilizados para la RPP (Tabla 1), donde se puede observar que los sistemas pluricelulares (plantas y animales transgénicos) mantienen ventajas en la elaboración de proteínas que requieren de modificaciones postraduccionales para su aplicación en organismos superiores, especialmente glicosilaciones. Aquellos basados en factorías unicelulares, en específico bacterias y levaduras, además de presentar similares características en la RPP, se

muestran como una alternativa debido a sus ventajas con relación a aspectos económicos, facilidad de manipulación genética, así como técnicos del bioproceso y de purificación.

Tabla 1. Comparación de diferentes factorías celulares utilizadas en la producción de proteínas recombinantes de interés farmacológico (Houdebine, 2009).

Puntos de consideración	Sistemas de producción					
	Bacteria	Levadura	Células de insecto +baculovirus	Células animales (Células CHO)	Plantas transgénicas	Animales transgénicos
Nivel de producción teórico	+++++	+++++	+++	+	+++++	+++++
Nivel de producción práctico	++ (+)	++ (+)	+	+	++	++++
Costo de inversión	+++++	+++++	++	+	++++	+++
Costo de producción	+++++	+++++	++	++	+++++	++++
Flexibilidad	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Conservación de la línea	+++++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
Estabilidad de la línea	+++++	+++++	++++	+++	+++++	+++++
Demora para la primera producción	+++++	+++++	+++	+++++	++++	+++ (+)
Escalado	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Recolección	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
Efecto sobre el microorganismo	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	+++
Modificaciones post-traduccionales	+	++	+++	++++	+++	++++
Glicosilaciones	+	++	+++	++++	++	++++
Estabilidad del producto	+++++	+++++	+++	+++	++++	++++
Purificación	+++	+++	+++	++++	+++	+++
Patógenos contaminantes	+++++	+++++	+++++	++++	+++++	++++
Propiedad intelectual	++++	+++	+++	++	+++	+++
Productos en el mercado	+++++	+++	+++	+++++	+	+++

Por otra parte, Kim *et al.* (2016), propusieron criterios que permiten valorar si un organismo es el adecuado para ser utilizado como factoría celular en la obtención de bioproductos (RPP y metabolitos) tales como:

- Su fisiología celular (utilización de sustrato, demanda de nutrientes y subproductos metabólicos).
- La robustez del sistema con relación a la tolerancia al estrés y estabilidad genética.

- Una red metabólica equilibrada y caracterizada (proveedores de precursores metabólicos, energía y equivalentes redox para la elaboración de productos)
- La capacidad de manipulación (facilidad de manipulación genética y disponibilidad de los métodos adecuados)

De entre las principales ventajas que tiene el uso de levaduras en comparación con plataformas de expresión animales como las células CHO, está la mayor estabilidad genómica, capacidad de integración transgénica dirigida y la presencia en menor cantidad de proteínas contaminantes propias del hospedero durante la secreción de proteínas heterólogas (Love *et al.*, 2018).

El uso de levaduras como *S. cerevisiae* ha demostrado poseer ventajas en el cumplimiento de dichos criterios, además de compartir características de organismos unicelulares tales como el crecimiento a altas densidades celulares en una amplia variedad de fuentes de carbono y la disponibilidad de técnicas de manipulación genética, cuenta con la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales propias de los organismos eucariotas. (Çelik and Çalık, 2012; Overton, 2014; Wagner and Alper, 2016).

Específicamente, las glicosilaciones han mostrado ser cruciales en la síntesis de productos biofarmacéuticos debido a que son las responsables de ciertas características propias de este tipo de moléculas como: la solubilidad, estabilidad, inmunogenicidad, actividad biológica, y farmacocinéticas. Aunque *S. cerevisiae* es capaz de realizar este tipo de modificaciones, éstas a su vez presentan una alta tasa de hipermanosilación, lo cual genera un problema durante la obtención de proteínas humanizadas, ya que puede conducir a una disminución de la actividad de la proteína y/o la generación de reacciones inmunológicas no deseadas (Pekarsky *et al.*, 2018; Baghban *et al.*, 2019).

1.2 *Pichia pastoris*, una levadura no convencional emergente

S. cerevisiae ha sido históricamente la levadura más estudiada y caracterizada en la producción de proteínas recombinantes (Fidan and Zhan, 2015; Huang *et al.*, 2017; Baghban *et al.*, 2019) y metabolitos (Lian *et al.*, 2018). Además de ser el primer organismo eucariota en ser secuenciado (Goffeau *et al.*, 1996), tiene el reconocimiento como organismo GRAS (*generally regarded as safe*) (Lian *et al.*, 2018). Sin embargo, en los últimos años ha emergido el uso de levaduras alternativas a *S. cerevisiae* denominadas

como no convencionales debido al potencial que ofrecen en relación al requerimiento de nuevas rutas metabólicas para la ingeniería de la producción de metabolitos, perfiles de productos deseados y fisiología en general (Wagner and Alper, 2016).

Yarrowia lipolytica, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arxula adenivorans*, *Hansenula polymorpha* (*Ogataea angusta*), *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *C. galbrata* y *Pichia pastoris* (recientemente clasificada como *Komagataella phaffii*) son claros ejemplos de levaduras propuestas y ampliamente descritas en varios estudios (Çelik and Çalık, 2012; Kim *et al.*, 2015; Wagner and Alper, 2016; Raschmanová *et al.*, 2018; Rebello *et al.*, 2018). Dentro de estos microorganismos, *P. pastoris* ha demostrado ser una excelente alternativa a las factorías convencionales previamente descritas (Gasser and Mattanovich, 2018).

P. pastoris, es una levadura metilotrófica aislada por primera vez en la región de Yosemite (California-USA) por la compañía *Phillips Petroleum* alrededor del año 1960, y utilizada en sus inicios para la producción a gran escala de proteína unicelular (*SCP*) debido a su capacidad de metabolizar el metanol. Sin embargo, la crisis del petróleo en el año 1973 incrementó el precio de dicho sustrato haciendo inviable la producción de *SCP*, por lo que la investigación para dichos fines fue abandonada (Ahmad *et al.*, 2014). Años más adelante, Cregg *et al.* (1989) caracterizaron los genes responsables de la actividad alcohol oxidasa en *P. pastoris*, lo cual, hizo emerger nuevamente el uso de dicha levadura como factoría celular para la producción de proteínas recombinantes (Cregg *et al.*, 1993). Hasta el día de hoy, más de 5000 proteínas recombinantes han sido exitosamente producidas en esta factoría celular (Chang *et al.*, 2018). Actualmente las cepas utilizadas de *P. pastoris* para la RPP provienen de la cepa NRRL Y-11430 del “*Agriculture Research Service culture collection*” (ARS) (Peoria IL, USA); la cual también fue depositada con código CBS7435 en el “*Centraalbureau voor Schimmelcultures*” (Utrecht, The Netherlands) (Sturmberger *et al.*, 2016). Dicha cepa dio lugar a los hospederos más conocidos para la expresión de proteínas recombinantes como son la cepa auxotrófica para histidina GS115 (*his4*) y la prototrófica X-33 (Küberl *et al.*, 2011). Del mismo modo se han generado otras variantes de acuerdo a las necesidades de la plataforma de expresión, como ejemplo se pueden citar las cepas GS200 (*his4*, *Arg4*) auxotrófica para histidina y arginina, KM71 (*his4 arg4 aox1Δ::ARG4*) auxotrófica para histidina y con el gen *AOX1* suprimido, MC100-3 (*his4 arg4 aox1Δ::ARG4 aox2Δ::Phis4*) generada al suprimir los genes *AOX1* y *AOX2*, SMD1165 (*his4 prb1*) auxotrófica para

histidina y el gen *PRB1* de la proteinasa B suprimido, SMD1168 (*his4 pep4*) auxotrófica para histidina y con el gen *PEP1* de la proteinasa A suprimido, SMD1163 (*his4 pep4 prb1*) auxotrófica para histidina y con los genes *PREP4* y *PRB1* suprimido de entre otras (Juturu and Wu, 2018).

Tabla 2. Resumen de las principales ventajas de *P. pastoris* como sistema de producción de proteínas recombinantes (RPP).

Ingeniería genética
<p>Herramientas de manipulación genética disponibles tales como:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Amplia diversidad de promotores disponibles con diferente tipo de regulación: Constitutiva, inducible, desreprimible (P_{GAP}, P_{PGK}, P_{FDH}, P_{DASI}, P_{THI1}, P_{PYK}, P_{SDH}) (Periyasamy <i>et al.</i>, 2013; Gasser <i>et al.</i>, 2015; Landes <i>et al.</i>, 2016; Juturu and Wu, 2018; Massahi and Çalik, 2018). - Edición génica a través del uso de tecnologías CRISPR/Cas9 (Raschmanová <i>et al.</i>, 2018; Weninger <i>et al.</i>, 2018) y tecnologías Cre-loxP (C. Li <i>et al.</i>, 2017; D. Li <i>et al.</i>, 2017) Disponibilidad de diversos péptidos señal que permitan incrementar la eficiencia en la secreción de proteínas recombinantes (Massahi and Çalik, 2016; Barrero <i>et al.</i>, 2018). - Generación de cepas recombinantes a través de recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ) (Schwarzahns <i>et al.</i>, 2016a, 2016b).
Procesamiento de proteínas
<p>Capacidad de realizar modificaciones postraduccionales como:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ensamblaje y plegamiento de proteínas relativamente complejas, así como la formación de puentes disulfuros (Yang and Zhang, 2018). - Capacidad de realizar glicosilaciones, con reducidas tasas de hiperglicosilación e hipermanosilación a diferencia de <i>S. cerevisiae</i>, las cuales han sido reportadas como un gran desafío al momento de generar proteínas humanizadas, pues generan reacciones de inmunorechazo (Ahmad <i>et al.</i>, 2014; Rebello <i>et al.</i>, 2018). <i>P. pastoris</i> no muestra el mismo patrón de glicosilación de las células de mamífero, pero se ha conseguido <i>ingenierizar</i> los patrones de glicosilación con tal de humanizar las proteínas de interés. Así, se han diseñado cepas comerciales capaces de producir proteínas humanizadas (<i>Pichia Glycoswitch</i>®, Biogrammatix) (Laukens <i>et al.</i>, 2015). - Capacidad de segregar eficazmente proteínas recombinantes con bajos niveles de proteínas nativas (García-Ortega <i>et al.</i>, 2019).
Ingeniería de bioproceso
<ul style="list-style-type: none"> - Reconocimiento como organismo GRAS, debido a que carece de endotoxinas detectables. Además, cuenta con la aprobación de otras agencias reguladoras internacionales como: EMA, PMDA, CDSCO y CFDA (Vogl and Glieder, 2013; Love <i>et al.</i>, 2018). - Crecimiento no fermentativo en glucosa (conocido como efecto <i>Crabtree-negative</i>), el cual le permite mantener el metabolismo respiratorio bajo condiciones de exceso de fuente de carbono como glucosa en condiciones aerobias (Prielhofer <i>et al.</i>, 2015). - Crecimiento en medio definido llegando a altas densidades celulares por encima de 150 g L⁻¹ (Jahic <i>et al.</i>, 2006). - Capacidad de producción a gran escala en planta piloto (Zhao <i>et al.</i>, 2008).

Las características que hacen a *P. pastoris* un sistema de expresión prometedor se resumen a continuación en la Tabla 2. Estas cubren diferentes campos como la ingeniería genética, el procesamiento de proteínas y la ingeniería del bioproceso.

Finalmente, cabe mencionar que, junto a las características previamente descritas, el creciente conocimiento del metabolismo de *P. pastoris* ha incrementado el interés en explorar dicho potencial con el objetivo de producir tanto metabolitos primarios como secundarios, lo cual ha abierto las puertas hacia el desarrollo de la ingeniería metabólica como un nuevo frente en la investigación sobre esta levadura (Peña *et al.*, 2018).

1.3 Estrategias para a un desarrollo integrado de *P. pastoris* como plataforma de expresión

Si bien *P. pastoris* ha demostrado ser una plataforma sólida y de amplio espectro de aplicación, la creciente demanda de proteínas recombinantes en el mercado ha impulsado grandes esfuerzos dedicados a incrementar su eficiencia y rentabilidad del bioproceso. Por lo tanto, se han propuesto dos grandes enfoques complementarios para tal fin (Fig. 1.1):

- a) La ingeniería de cepas, la cual ha permitido generar clones con características mejoradas según las necesidades del bioproceso o de la proteína recombinante (Juturu and Wu, 2018; Vogl, Gebbie, *et al.*, 2018).
- b) La ingeniería de bioproceso propiamente dicha, que permite una rentabilización de los recursos, así como determinar las condiciones ideales de producción, que a su vez permitan su escalado y su viabilidad industrial (Theron *et al.*, 2018; Yang and Zhang, 2018).

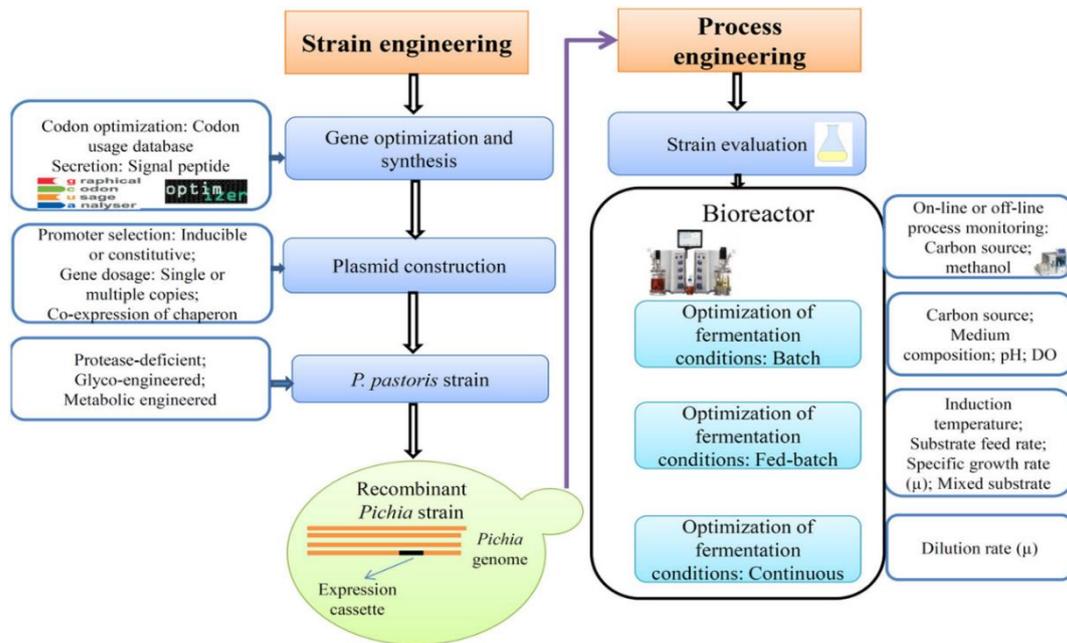


Fig. 1.1. Resumen de las estrategias desarrolladas para la optimización de la RPP en *P. pastoris* (Yang and Zhang, 2018).

1.3.1 Ingeniería de cepas

El uso de técnicas de biología molecular ha permitido grandes avances en la generación de cepas de *P. pastoris* cada vez más eficientes y adaptables a la producción de proteínas recombinantes. La selección y búsqueda de promotores altamente regulados (Kang *et al.*, 2017), el desarrollo de péptidos señal para la secreción de proteínas recombinantes al medio extracelular (Massahi and Çalık, 2016), el uso de marcadores de selección que permitan la selección de clones recombinantes (Kang *et al.*, 2017), la depuración de los procesos de recombinación genómica mediante el uso de técnicas de edición génica como CRISPR/Cas9 y Flp-*frt*/Cre-*lox* (C. Li *et al.*, 2017; Weninger *et al.*, 2018), y la optimización de codones (Chang, Lee, *et al.*, 2006) se han desarrollado exitosamente. Entre ellos, la tecnología de promotores ha demostrado ser determinante para la producción de proteínas recombinantes y la más desarrollada a nivel de la bibliografía (Cregg *et al.*, 1989; Cereghino and Cregg, 2000; Vogl and Glieder, 2013; Çalik *et al.*, 2015).

1.3.1.1 *Promotores como herramientas que permiten modular la expresión de proteínas recombinantes*

La transcripción es considerada un paso crítico en la expresión de proteínas. Por lo tanto, la identificación, caracterización e ingeniería de promotores fuertes y regulables es esencial durante el diseño de bioprocesos utilizando *P. pastoris* como factoría celular (Kang *et al.*, 2017).

De acuerdo con su comportamiento durante la expresión de proteínas, los promotores pueden clasificarse como:

- Constitutivos: Cuando la expresión de estos es asociada al crecimiento celular, permitiendo a través de éste el control de la producción (Weinhandl *et al.*, 2014).
- Inducibles: A diferencia de los promotores constitutivos, los promotores inducibles permiten desacoplar la formación del producto con el crecimiento celular ya que necesitan la presencia de un inductor para activar su expresión, lo cual es una ventaja en el caso de expresión de proteínas que impliquen cierta toxicidad, ya que permite diferenciar claramente la fase de crecimiento celular de la fase de producción (Schwarzthans *et al.*, 2017).
- Desreprimibles: A diferencia de los promotores inducibles que requieren de un inductor, en el caso de los promotores desreprimibles existe un represor el cual inhibe la expresión del promotor. Así, cuando este agente se encuentra a muy bajas concentraciones o no está presente, permite la expresión del promotor y del gen que se encuentra asociado (Vogl, Kickenweiz, *et al.*, 2018; Fischer *et al.*, 2019).

Históricamente desde la descripción de los primeros promotores responsables de la actividad alcohol oxidasa (Cregg *et al.*, 1989, 1993) a la actualidad, se han descrito una gran variedad de promotores tanto constitutivos como inducibles y en los últimos años desreprimibles, lo cual ha permitido clasificarlos en dos grandes grupos que se desarrollarán a continuación: Los promotores clásicos y los alternativos.

Promotores clásicos

La fuerte regulación que sufren los genes de *P. pastoris* responsables de metabolizar el metanol han sido tomados como referencia para la selección de primeros promotores utilizados para la RPP, específicamente, los asociados a la actividad alcohol oxidasa.

Cregg et al., 1989 determinó que no sólo un gen sino dos eran los responsables de dicha actividad enzimática, los genes *AOX1* y *AOX2* (Cregg et al., 1989). Ambos genes codifican dos isoformas, con una identidad del 97 %, de la enzima alcohol oxidasa. Sin embargo, los promotores que gobiernan su expresión muestran importantes diferencias en los niveles de expresión (Jungo et al., 2006). Se ha observado que una vez inducida la actividad alcohol oxidasa por metanol, el promotor *AOX1* (P_{AOX1}) es el responsable de aproximadamente el 85 % de la actividad Aox observada. Además, una vez inducido el gen *AOX1* los niveles de esta proteína pueden llegar a ser un 30% del total de proteína intracelular soluble, lo cual sustenta el amplio uso que se ha dado al P_{AOX1} para la RPP debido a su fuerza y alta regulación (Krainer et al., 2012). Por otro lado, aunque el gen *AOX2* no muestra el mismo potencial que *AOX1*, ha permitido el diseño de nuevas cepas con propiedades específicas en relación al uso de metanol (*methanol utilisation* Mut) (Potvin et al., 2012; Looser et al., 2015): En función de estas se han establecido tres fenotipos diferentes:

- Mut⁺: Donde ambos genes *AOX1* y *AOX2* son funcionales. Aunque cuenta con una alta sensibilidad a la presencia de metanol al tener totalmente activo el sistema de asimilación, se dificulta el control y escalado del sistema. Esto es debido a que, desde el punto de vista operacional este fenotipo tiene altos requerimientos de aporte de oxígeno y control de temperatura para disipar calor generado durante el consumo de metanol. Por otra parte, los altos niveles de expresión de la enzima Aox1 pueden competir por la maquinaria celular responsable de la expresión de proteínas recombinantes que son controladas bajo el mismo promotor, por lo tanto, disminuyendo los rendimientos de producto esperados.
- Mut^S: Cuentan con el gen *AOX1* inactivado (*knock-out*), por lo tanto, el consumo de metanol es limitado a la expresión del gen *AOX2*. Aunque este fenotipo cuenta con una menor velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) creciendo sobre

metanol, en contrapartida, los problemas operacionales anteriormente comentados para las cepas Mut⁺ se ven muy reducidos.

- Mut⁻: Ambos genes responsables de la actividad alcohol oxidasa están inactivados. Esto las hace incapaces de metabolizar metanol, el cual sólo actuará en estos casos como agente inductor y no como fuente de carbono como en los casos anteriores.

P_{AOXI} ha sido sujeto de muchos estudios que han permitido caracterizar sus mecanismos de control. Se conoce que su expresión es inhibida por catabolito, llegado a ser reducida a niveles casi indetectables en presencia de glucosa y en menor proporción de glicerol (Potvin *et al.*, 2012). Sin embargo, en ausencia o a concentraciones muy bajas de dichas fuentes de carbono, el promotor es desreprimido llegando a detectarse un 2-4% de la actividad del promotor nativo AOX1 en comparación a los niveles observados bajo la inducción por metanol (Vogl and Glieder, 2013). Finalmente, además del extendido uso del promotor AOX1 para la RPP en diversos estudios (Barrigón *et al.*, 2013; Ponte *et al.*, 2016; Cámara *et al.*, 2017) y la comprensión básica de su mecanismo de control; se han podido establecer las bases moleculares de su regulación, habiéndose caracterizado una serie de elementos reguladores (tipo *cis*, *trans* y *core promoter sequences*) críticos para el proceso de activación de la maquinaria de transcripción activadora del sistema de expresión. Este conocimiento ha permitido *ingenierizar* el promotor y hasta desarrollar promotores sintéticos basados en las secuencias reguladoras (Vogl and Glieder, 2013; Portela *et al.*, 2018).

A pesar de las características positivas descritas para el P_{AOXI}, en cuanto a la expresión de proteínas recombinantes, éste presenta serias restricciones propias del uso de metanol. El uso industrial de plataformas de RPP basadas en P_{AOXI} requieren adoptar medidas de seguridad debido al peligro que supone el metanol por ser un compuesto peligroso e inflamable; además de los problemas operativos derivados de la alta producción de calor y demanda de oxígeno (Prielhofer *et al.*, 2013), carga metabólica (Hartner and Glieder, 2006) y lisis celular desencadenada por la liberación de proteasas (Mattanovich *et al.*, 2009). El uso de cepas Mut^S han permitido disminuir los problemas asociados a la alta demanda de oxígeno y producción de calor, sin embargo disminuye la velocidad máxima de crecimiento, lo que se puede subsanar utilizando sustratos mixtos (metanol y glicerol/sorbitol), llegándose, en algunos casos, a obtenerse producciones hasta 4 veces mayores en comparación con las cepas Mut⁺ (Theron *et al.*, 2019). Sin

embargo, la tendencia a generar clones recombinantes independientes de la inducción por metanol se mantiene constante en trabajos recientes (Prielhofer *et al.*, 2013; Vogl, Sturmberger, *et al.*, 2018).

Debido a las limitaciones observadas anteriormente, la necesidad de buscar alternativas al promotor *AOXI* ha propiciado el uso de promotores constitutivos provenientes del metabolismo de carbono. Uno de los promotores pioneros fue el de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*TDH3/GAPDH*), una enzima propia de la ruta de la glicólisis, conocido como promotor *GAP* (P_{GAP}). A diferencia del promotor *AOXI*, el promotor *GAP* es un promotor constitutivo por lo que su expresión está fuertemente acoplada al crecimiento, lo cual es útil para proteínas recombinantes que no ejerzan efectos tóxicos que inhiban la proliferación celular (Çalik *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha visto que su expresión es modulable según la fuente de carbono utilizada. Mientras que el uso de glucosa se muestra como principal sustrato e inductor del P_{GAP} , el uso de otras fuentes de carbono muestra una reducción de los niveles de actividad de dicho promotor a dos tercios en el caso del glicerol, a la mitad en ácido oleico y a un tercio en presencia de metanol (Waterham *et al.*, 1997; Cereghino and Cregg, 2000). El uso de fuentes de carbono como glucosa y glicerol ha permitido al promotor *GAP* ser una prometedora alternativa a los sistemas inducibles por metanol (*AOXI*); específicamente, porque resuelve muchas de las desventajas derivadas del uso de dicho compuesto, además que el consumo de glucosa y glicerol representan alternativas de sustratos de fácil manipulación. El consumo de dichos sustratos ha mostrado ser menos dependiente de oxígeno en comparación al de metanol e incluso se ha visto que bajo condiciones limitantes de oxígeno (hipoxia) puede incrementar la productividad de cepas expresando un fragmento del anticuerpo Fab 3H6 (Baumann *et al.*, 2008). Finalmente se ha observado que su consumo de glucosa y glicerol generan menores emisiones de calor, lo cual es una ventaja desde el punto de vista del control de bioprocesos (Garcia-Ortega *et al.*, 2013).

Al igual que en el caso del uso del promotor *AOXI* diversas proteínas se han expresado bajo el control del promotor *GAP* (Garcia-Ortega *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2016; Adelantado *et al.*, 2017). Sin embargo, no es fácil determinar de forma genérica si un promotor es más eficiente que otro pues la efectividad depende mucho de las características de la proteína expresada y de la optimización de la ingeniería del bioproceso, dándose casos en la bibliografía donde el uso del P_{GAP} muestra ventajas sobre el P_{AOXI} y viceversa (Hohenblum *et al.*, 2004; Delroisse *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009).

La búsqueda de nuevas alternativas al P_{GAP} y P_{AOXI} mediante el uso de las tecnologías de ingeniería de promotores

Aunque el uso de los promotores clásicos *GAP* y *AOXI* ha sido ampliamente descrito, tener sólo dos promotores disponibles da un margen muy limitado de trabajo.

Es por ello y junto a la necesidad de incrementar la eficiencia de *P. pastoris* como factoría celular, ya sea para la RPP, o para la expresión diferenciada de genes diana en el desarrollo de tecnologías de ingeniería metabólica, que se ha requerido del desarrollo de una caja de herramientas (*toolbox*) de diversos promotores modulables que cubran un amplio rango de niveles de expresión. Por este motivo se han identificado y desarrollado nuevos promotores alternativos de naturaleza inducible (dependientes o no de metanol), desreprimible y constitutiva, que han demostrado ser altamente competitivos al comparar con P_{AOXI} y P_{GAP} (Kang *et al.*, 2017; Yang and Zhang, 2018). Así, se está llevado a cabo dos grandes enfoques: La búsqueda de promotores nativos o el diseño de nuevos promotores sintéticos.

La búsqueda de promotores provenientes de la caracterización de rutas metabólicas o mediante la detección de genes fuertemente inducidos por determinados estímulos externos (tipo de fuente de carbono, su concentración, etc.) ha demostrado ser muy útil en la identificación y cribado de promotores de alto potencial. Vogl *et al.*, 2016, realizó el estudio de 49 promotores involucrados en el metabolismo de metanol (MUT) de los cuales 15 fueron altamente regulados por metanol y propuestos como alternativas. En concreto, el promotor *CATI*, propio de una proteína involucrada en la defensa de especies reactivas de oxígeno ROS, ha mostrado ser reprimible por glucosa e inducible por metanol como el P_{AOXI} . Sin embargo, muestra mayores niveles de actividad (derepresión) en ausencia del metanol (Vogl *et al.*, 2016). Este enfoque se ha extendido también al desarrollo de promotores constitutivos como es el caso de los promotores de las enzimas piruvato descarboxilasa (*PDC*) y piruvato kinasa (*PYK*), propias del metabolismo central de glucosa, los cuales demostraron incrementar la productividad recombinante de la hormona humana del crecimiento (rhGH) en comparación al promotor *GAP* (Massahi and Çalık, 2018). También el promotor de la 3-fosfoglicerato kinasa (*PGKI*) mostró ventajas sobre el promotor *AOXI* en la producción de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* (Moreira de Almeida *et al.*, 2005). Del mismo modo, Prielhofer *et al.* (2017), llevó a cabo el rastreo de 20 promotores provenientes de diversas rutas

metabólicas. Dicha información permitió establecer una librería de promotores para establecer el sistema de expresión modular conocido como Golden*Pi*CS. Esta estrategia, ha sido perfeccionada al punto de permitir la detección de promotores nativos que puedan adaptarse a condiciones de exceso o limitación de glucosa mediante el análisis de los niveles de expresión utilizando cultivos en *batch* y quimiostato (Prielhofer *et al.*, 2013).

Junto a los promotores antes mencionados, se han estudiado otras rutas que han permitido encontrar nuevos promotores como: la del metabolismo del sorbitol (P_{SDH}), tiamina (P_{THII}), del ciclo del glioxilato (P_{ICLI}), el transporte de fósforo P_{NPS} , etc. (Periyasamy *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2014; Juturu and Wu, 2018). Todos estos estudios sugieren que a medida que se profundiza más en el estudio de los procesos celulares en *P. pastoris* se pueden obtener nuevas fuentes de promotores aún no descritos.

Mientras que los promotores nativos requieren ser caracterizados para determinar su fuerza y la maquinaria implicada en su regulación, el uso de promotores sintéticos ha abierto una nueva puerta para el diseño racional de promotores basados en la modificación/diseño direccionado de la secuencia genética, relacionada con los factores involucrados en el proceso de expresión. Por lo tanto, el nivel de conocimiento disponible de un determinado promotor será determinante para conocer el espectro de cambios posibles sobre los elementos reguladores de su expresión.

En este sentido, diversos esfuerzos han permitido elucidar sólidamente la regulación de promotores como P_{AOXI} y P_{GAP} ; mientras que para otros promotores como P_{DAS} (dihidroxiacetona sintasa), P_{PGKI} (fosfoglicerato kinasa), P_{TEFI} (factor de elongación 1 alfa), P_{AOD} (oxidasa alternativa) P_{PHO89} (simportador de fosfato acoplado a sodio) se han caracterizado, pero aún no en la misma medida que los promotores clásicos (Vogl and Glieder, 2013).

El conocimiento de los elementos reguladores *cis* (*CRM*), en específico de los sitios de unión a factores de transcripción (*transcription factor binding sites*, *TFBS*), ha permitido generar promotores sintéticos basados en el P_{AOXI} y P_{GAP} mediante la duplicación, supresión o modificación de estos elementos (Hartner *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2011; Ata *et al.*, 2017); e incluso promotores recién caracterizados como P_{GTHI} (Prielhofer *et al.*, 2013) que han sido mejorados utilizando el diseño racional (Prielhofer *et al.*, 2018). Finalmente, el uso de secuencias centrales del promotor (*core promoter sequences*), descritos como secuencias cruciales que proporcionan sitios de unión para factores de

transcripción generales y la RNA polimerasa II, han mostrado mejores potenciales incluso que los *CRMs* en la generación de nuevos promotores. Esto es debido a que no se hallan sujetos a una regulación específica, generando una tendencia reflejada en los últimos años en el diseño de nuevos promotores basados en el P_{AOXI} (Vogl *et al.*, 2014; Portela *et al.*, 2017, 2018).

1.4 El reto de los cuellos de botella en la producción de proteínas recombinantes (RPP)

En los apartados anteriores se ha demostrado ampliamente las múltiples ventajas de utilizar a *P. pastoris* como factoría celular. Se ha demostrado que el conocimiento de los procesos que puedan generar limitaciones ha permitido inclusive abrir nuevos horizontes de mejora que permitan transformar estas desventajas en oportunidades (Hohenblum *et al.*, 2004; Inan *et al.*, 2006; Vogl, Gebbie, *et al.*, 2018). Es por ello por lo que se han dedicado grandes esfuerzos en conocer las limitaciones que presenta *P. pastoris* durante la expresión y síntesis de proteínas heterólogas.

1.4.1 Variabilidad clonal

Durante la generación de cepas recombinantes en *P. pastoris*, la variabilidad clonal ha mostrado ser un proceso intrínseco que proporciona cepas con diferentes características (Aw *et al.*, 2017). Es importante tener en cuenta que dicho fenómeno no se restringe a producir efectos perjudiciales sobre el rendimiento de los transformantes obtenidos, sino que también puede incrementar sus capacidades productoras (Schwarzahns *et al.*, 2016b). Por lo tanto, requiere de un proceso de *screening* que permita la selección del clon que reúna las características óptimas para un determinado objetivo.

Se ha determinado que la variabilidad observada en *P. pastoris* es debida a su capacidad de integrar los vectores de expresión mediante dos sistemas alternativos:

- Por un lado, la recombinación homóloga (*Homologous recombination*, HR), mediante la cual regiones homólogas son utilizadas en la construcción del vector para llevar a cabo la recombinación en un locus deseado dentro del genoma. Como efecto colateral, se pueden dar múltiples eventos de recombinación homóloga en

el mismo locus generando integraciones conocidas como en *tandem* las cuales pueden ser consideradas la primera fuente de variabilidad clonal durante la transformación de cepas (Betancur *et al.*, 2017).

- En paralelo, la recombinación por unión de extremos no homólogos (*non-homologous end-joining*, NHEJ) conduce la integración del *cassette* de expresión en locus aleatorios del cromosoma (Schwarzahans *et al.*, 2017), siendo la segunda fuente de variabilidad y la más frecuente en comparación a la tasa de recombinación homóloga en *P. pastoris* (Raschmanová *et al.*, 2018).

Ambos procesos de recombinación han permitido generar clones con diferente número de copias al sufrir múltiples eventos de integración, lo cual ha sido estudiado desde el enfoque de la RPP. Por un lado, se ha descrito que el aumento del número de copias puede ser beneficioso para los niveles de expresión de proteínas heterólogas (Nordén *et al.*, 2011); sin embargo, otros casos han evidenciado que una mayor dosis génica puede afectar de forma negativa sobre las productividades (Aw and Polizzi, 2013; Dagar and Khasa, 2018). Este diferente comportamiento en relación al número de copias integradas del *cassette* de expresión, indica que la variabilidad clonal para la RPP no sólo depende de la dosis génica, sino que también existe una sinergia con el tipo de integración en el genoma y la naturaleza de la proteína de interés expresada; por lo tanto para cada caso se puede identificar una dosis génica óptima haciéndose necesaria una caracterización de los clones obtenidos a partir de la transformación de células de *P. pastoris* en la búsqueda del clon más eficiente y estable (Zahrl *et al.*, 2017).

Aunque la ingeniería de cepas ha permitido incrementar considerablemente las prestaciones de *P. pastoris* como factoría celular, es importante tener en cuenta que ésta no sólo se remite al uso de la ingeniería de promotores, sino que existen otros factores que inciden de forma positiva sobre este objetivo. Entre ellos se encuentran las propiedades intrínsecas de la cepa utilizada (cepas auxotróficas, deficientes en proteasas, con diferentes patrones de glicosilación), el uso de péptidos señal que guíen la proteína recombinante para su expresión intracelular o extracelular, además del uso de la ingeniería, dosificación y/o expresión de genes auxiliares que ayuden al procesamiento de proteínas y secreción (Ahmad *et al.*, 2014).

1.4.2 La respuesta de proteínas mal plegadas y la ruta de secreción

La capacidad de poder secretar proteínas heterólogas ha demostrado ser una de las principales ventajas en la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*, debido a que simplifica mucho el proceso de purificación más conocido como *downstream* (Cereghino *et al.*, 2002; García-Ortega *et al.*, 2019).

El proceso de secreción es guiado mediante un péptido señal, siendo el más utilizado para el caso de secreción de proteínas recombinantes, el α -mating factor (α -MF) de *S. cerevisiae* (Massahi and Çalık, 2016; Barrero *et al.*, 2018). Dicha secuencia está conformada por dos regiones conocidas como *pre* y *pro*, de las cuales la primera dirige a la proteína recombinante desde los ribosomas hacia el *lumen* del retículo endoplasmático (*Endoplasmic reticulum*, ER) mediante una serie de enzimas y chaperonas, para llevar a cabo el plegamiento de las proteínas. Después, la segunda región *pro* se encarga de trasladar la proteína a través de las vesículas COPII hacia el aparato de Golgi, encargado de realizar el proceso de glicosilación. Finalmente, el péptido señal es suprimido mediante la endo-proteasa Kex2p y la di aminopeptidasa Ste13p antes de ser secretada la proteína al medio extracelular mediante el transporte vesicular (Fig. 1.2) (Delic *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2014; Barrero *et al.*, 2018).

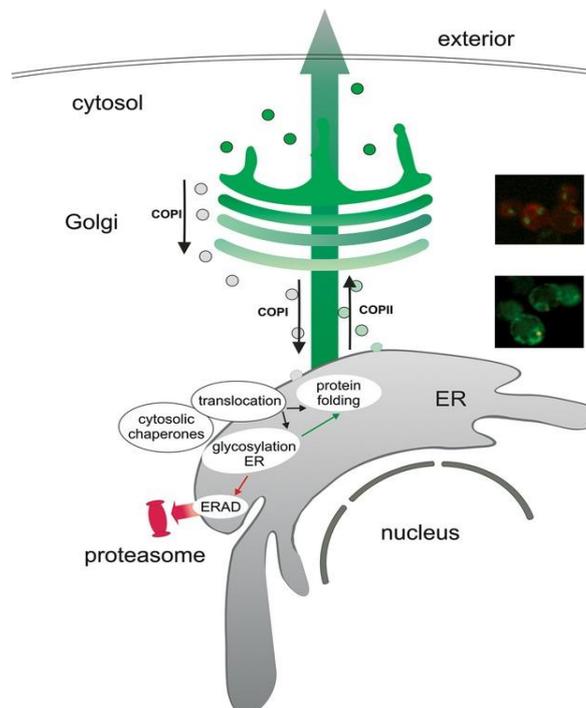


Fig. 1.2. Visión general de la vía de secreción de proteínas en *P. pastoris* (Delic *et al.*, 2013).

El proceso de secreción cuenta con varios puntos de control para evitar la liberación de proteínas defectuosas e inactivas. El plegamiento de proteínas en el ER ha demostrado ser un paso crítico en *P. pastoris*, sobre todo durante la expresión de proteínas recombinantes. Ello puede sobrecargar la maquinaria implicada en este proceso, activando una reacción conocida como la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (*Unfolding protein response*), considerada una reacción importante al estrés intrínseco producido por la RPP así como a reacciones de estrés ambiental (Dragosits *et al.*, 2011).

Aunque el mecanismo general de regulación del UPR para levaduras fue descrito en *S. cerevisiae*, dicho mecanismo ha sido también caracterizado en *P. pastoris* permitiendo un rápido avance en el conocimiento de los elementos reguladores clave del proceso y su efecto en la RPP (Delic *et al.*, 2013; Puxbaum *et al.*, 2015).

La activación de los genes involucrados en la UPR es dependiente de la acción del activador transcripcional Hac1, el cual se une a elementos reguladores *cis* de los genes implicados (Yu *et al.*, 2015). Sin embargo, la expresión del gen *HAC1* se encuentra altamente regulada por un mecanismo de retroalimentación el cual se describe en la Fig. 1.3.

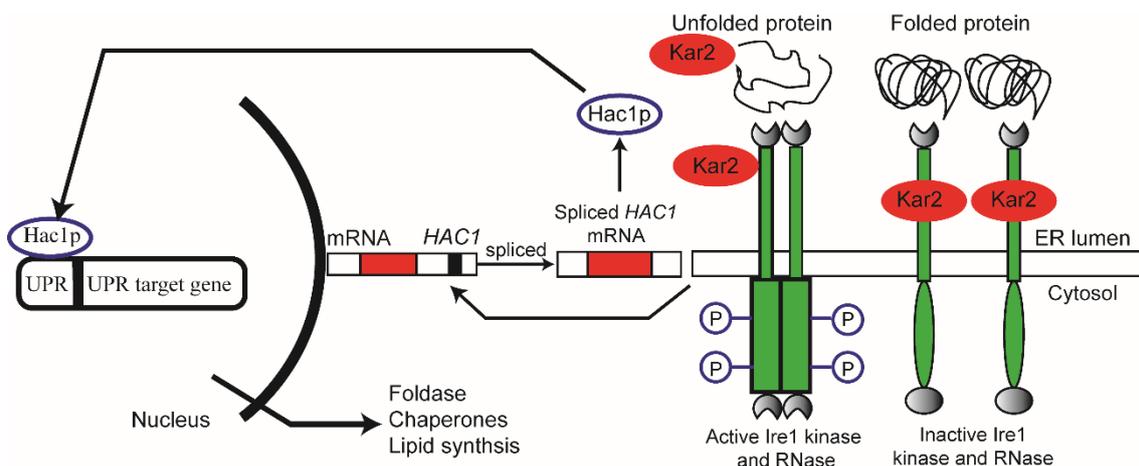


Fig. 1.3. Respuesta proteínas mal plegadas en *P. pastoris*. BiP (Kar2) se disocia de Ire1p durante el stress producido en el ER. (Adaptado de Yu *et al.*, 2015).

En condiciones normales, el mRNA correspondiente al gen *HAC1* no se encuentra activo debido a la presencia de un intrón que bloquea su traducción (Hesketh *et al.*, 2013). Su activación depende de la proteína Ire1, la cual se encarga de cortar la secuencia no

codificante, para luego los exones resultantes sean religados por la proteína Rlg1; la secuencia funcional es traducida a Hac1 y migra hacia el núcleo donde se unirá a los promotores de los genes de la UPR (Vogl and Glieder, 2013). La actividad de Ire1 se halla normalmente inhibida debido a que se encuentra asociada con la proteína Kar2, que actúa como un sensor que en presencia de proteínas mal plegadas o no plegadas se separa de Ire1 permitiendo su dimerización, lo que le otorga actividad permitiendo el procesamiento antes indicado del mRNA de *HAC1* (Hohenblum *et al.*, 2004). Dentro del grupo de genes activados gracias a Hac1 tenemos al *KAR2* que además de tener actividad de sensor, realiza la función de chaperona uniéndose a las proteínas mal plegadas asistiendo su correcto plegamiento mediante proteínas asociadas como la proteína disulfuro isomerasa (Pdi) junto a Ero1p (Vanz *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2017; Roth *et al.*, 2018); sin embargo, si la unión entre la proteína mal plegada y Kar2p se mantiene por un largo periodo, se desencadena el proceso de degradación asociada al ER (*Endoplasmic reticulum associated protein degradation*, ERAD) translocando la proteína al citosol para ser ubiquitinada y posteriormente degradada por el proteosoma (Zahrl *et al.*, 2018). Adicionalmente al ERAD se ha visto que también la existencia de una ruta degradativa en la vacuola a partir de los endosomas o el Golgi que ha abierto nuevos campos para la mejora de la RPP en *P. pastoris* (Marsalek *et al.*, 2019).

Finalmente, cabe resaltar la presencia de puntos de control a otros niveles como por ejemplo durante el procesamiento postraduccional en el aparato de Golgi ya que, si se detectase la presencia de proteínas defectuosas a este nivel, estas son redireccionadas mediante las vesículas COPI al ER (Puxbaum *et al.*, 2015).

1.5 Tecnología de bioproceso aplicada en el cultivo de *Pichia pastoris*

La ingeniería de bioprocesos ha mostrado ser crucial al momento de determinar las condiciones ideales que permitan maximizar la eficiencia del bioproceso (García-Ortega *et al.*, 2019). El conocimiento del comportamiento celular frente a diferentes condiciones durante la operación permitirá utilizar un diseño racional y proponer nuevas estrategias más robustas y sólidas que se ajusten a los requerimientos de procesos industriales (García-Ortega *et al.*, 2019). Finalmente, esta información también podrá ser utilizada como *feedback* para la mejora continua de los clones volviendo a utilizar

nuevamente la ingeniería de cepas para realizar modificaciones puntuales basadas en la información obtenida previamente.

1.5.1 Cultivos en continuo como una herramienta para el desarrollo racional de bioprocesos con la factoría celular *Pichia pastoris*

Para mejorar la eficiencia del bioproceso tanto en la obtención de metabolitos y/o proteínas de interés, con el objetivo de obtener mayores rendimientos y productividades, se requiere de un profundo entendimiento de las bases correspondientes a la fisiología celular y su efecto sobre las velocidades de producción y rendimientos. Esta información será específica para cada clon productor en particular ya que estará fuertemente influenciada por múltiples factores como: parámetros operacionales (temperatura, pH, osmolaridad, oxígeno disuelto y composición del medio), la cepa utilizada, las características intrínsecas de la proteína recombinante (complejidad, mecanismo de secreción y toxicidad), el efecto que pueda suponer el uso de varias proteínas heterólogas (sobre todo para el caso de producción de metabolitos), el uso de un determinado promotor, el tipo de integración y la dosis génica del *cassette* de expresión. Este conocimiento permitirá llevar a cabo el diseño racional del proceso, repercutiendo en la maximización de maximizar la eficiencia y competitividad de *P. pastoris* como factoría celular. Una visión de dichos fenómenos generalmente no es sencilla de obtener debido a la complejidad de las múltiples interacciones a diferentes niveles de la fisiología celular. Por lo tanto, los efectos de las condiciones de bioproceso en la factoría celular determinaran los valores de diferentes parámetros clave de interés (*key parameters of interest*, KPI) como pueden ser la producción (*titer*), productividades y rendimientos, los cuales requieren una determinación empírica.

En este sentido, para obtener dicha información de forma precisa, es necesario mantener a las células en condiciones de estado estacionario constante, ya sea con respecto a los parámetros fisicoquímicos de operación, como al estado metabólico. Así, el modo de operación en continuo, reportado por primera vez en 1920 (Cooney, 1979), corresponde al más básico modo de operación que permite obtener dichas condiciones.

Los cultivos en modo de operación en continuo son definidos como sistemas de fermentación en los cuales el medio de cultivo es alimentado de forma continua al

biorreactor y por otra parte el medio del biorreactor (que incluyen células y metabolitos) es del mismo modo retirado del fermentador (Fernandes *et al.*, 2015); por lo tanto, forzando la proliferación permanente de las células en un entorno constante alcanzando el estado estacionario (*steady-state*) (Gramelsberger, 2018).

Dentro de este modo de operación se utilizan dos grandes tipos de cultivos: Los quimiostatos y los turbidostatos (Prielhofer *et al.*, 2013; McGeachy *et al.*, 2019). Si bien ambos se pueden considerar análogos, se diferencian principalmente en el mecanismo de control del crecimiento celular. Por un lado, en los quimiostatos la adición de medio de cultivo presenta un determinado nutriente en condiciones limitantes para el crecimiento celular (Peebo and Neubauer, 2018); mientras que, por otro lado, en los turbidostatos se evita esta limitación y el crecimiento es controlado mediante la determinación de la turbidez a través de un sensor óptico el cual adiciona medio de cultivo a través de un lazo cerrado de control para mantener el punto de consigna. Esto permite que se puedan trabajar con una velocidad de crecimiento específica (μ) cerca de la μ_{max} , a diferencia de los quimiostatos que trabajan siempre debajo de esta para evitar el efecto de lavado (Gresham and Dunham, 2014; Fernandes *et al.*, 2015).

Existen variaciones hechas sobre estos tipos de cultivos conocidas como changestatos (*changestats*), los cuales han sido propuestos como una herramienta novedosa en la cual un parámetro de bioproceso es modificado de forma constante en un mismo experimento. Este enfoque permite obtener información rápida respecto a la respuesta celular frente a determinadas condiciones de bioproceso, lo que se conoce como análisis de crecimiento en estado estacionario (*growth space analysis*, GSA) (Adamberg *et al.*, 2015). Una visión general para su mejor comprensión de las estrategias utilizadas en cultivos en continuo se presenta en la Fig. 1.4.

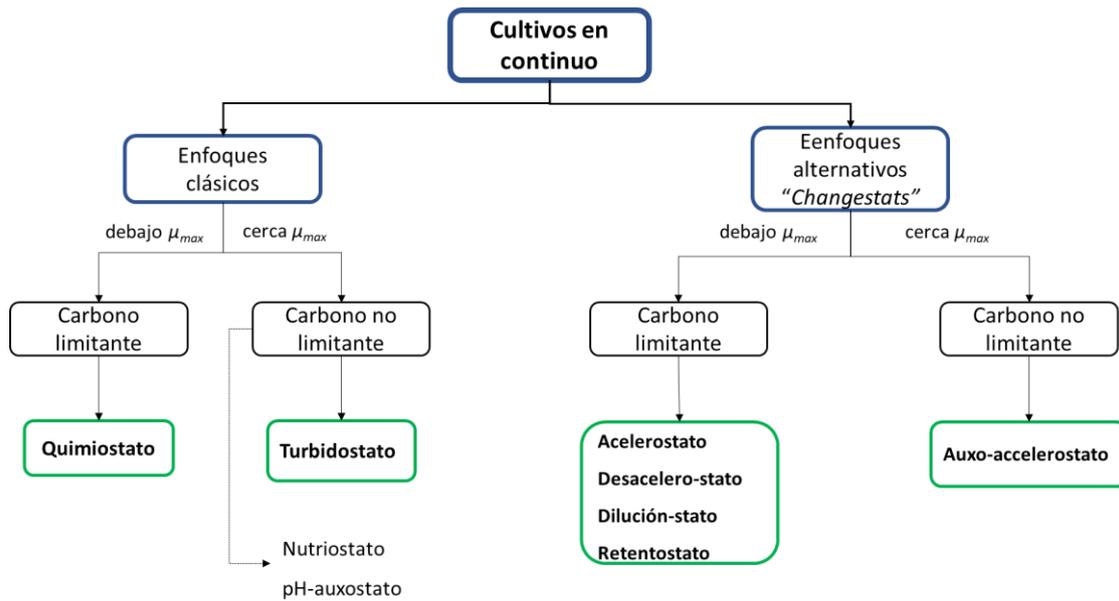


Fig. 1.4. Resumen de las diferentes estrategias de cultivo en continuo descritas para estudios de bioproceso.

En la actualidad, los cultivos en quimiostato, el más clásico de los cultivos en continuo, son considerados ideales para la caracterización del bioproceso (Hoskisson and Hobbs, 2005). Estos presentan una serie de ventajas respecto al uso de tipos de operación como son los cultivos en *batch* o *fed-batch*, tradicionalmente más utilizados. Esto se debe al hecho que los quimiostatos permiten trabajar en condiciones de estado estacionario (*steady-state*), lo que proporciona datos de alta robustez y reproducibilidad cuando se evalúa el efecto de un parámetro específico manteniendo los demás constantes a una velocidad de crecimiento constante. Por lo tanto, permiten investigar el efecto de ciertas condiciones de cultivo como la composición de medios, fuentes de carbono y nitrógeno, y las velocidades específicas de crecimiento para optimizar su uso; así como la caracterización fisiológica de nuevas cepas y la cinética de biorreacción. Un claro ejemplo del uso de este enfoque en *P. pastoris* fue el descrito por Cankorur-Cetinkaya *et al.* (2018) durante el desarrollo de un nuevo medio en la producción del fragmento del anticuerpo Fab 3H6 y de la lisozima humana (HuLy) en cultivos en quimiostato. En dichos cultivos se pudo determinar el efecto de la adición de aminoácidos (tirosina, triptófano y fenilalanina) sobre la productividad de ambos productos; en particular, la adición de tirosina sobre el medio de cultivo mostró efectos positivos sobre la RPP de ambas proteínas. Así, se han descrito una gran cantidad de ejemplos que permiten reforzar el uso de este modo de operación en la caracterización de diferentes condiciones de bioproceso (Nieto-Taype *et al.*, 2019).

El desarrollo creciente de nuevas tecnologías por parte de la biología molecular ha generado un renacimiento del uso de los cultivos en quimiostato. Han pasado de ser utilizados en la caracterización de las cinéticas de bioproceso y estudios de adaptación evolutiva en laboratorio (ALE) (Bull, 2010), a ser considerados como una poderosa herramienta cuando se busca una comprensión profunda del comportamiento celular frente a las características propias del clon utilizado (ingeniería de cepas) o como respuesta a estímulos externos (estrategias operativas y/o de estrés ambiental). Dicho nivel de conocimiento se ha logrado obtener desde el enfoque de la biología de sistemas, el cual integra datos obtenidos a diferentes niveles de la transcriptómica, proteómica, metabolómica y fluxómica (Graf *et al.*, 2009), con el objeto de generar una visión global del sistema biológico tal como se muestra en la Fig. 1.5.

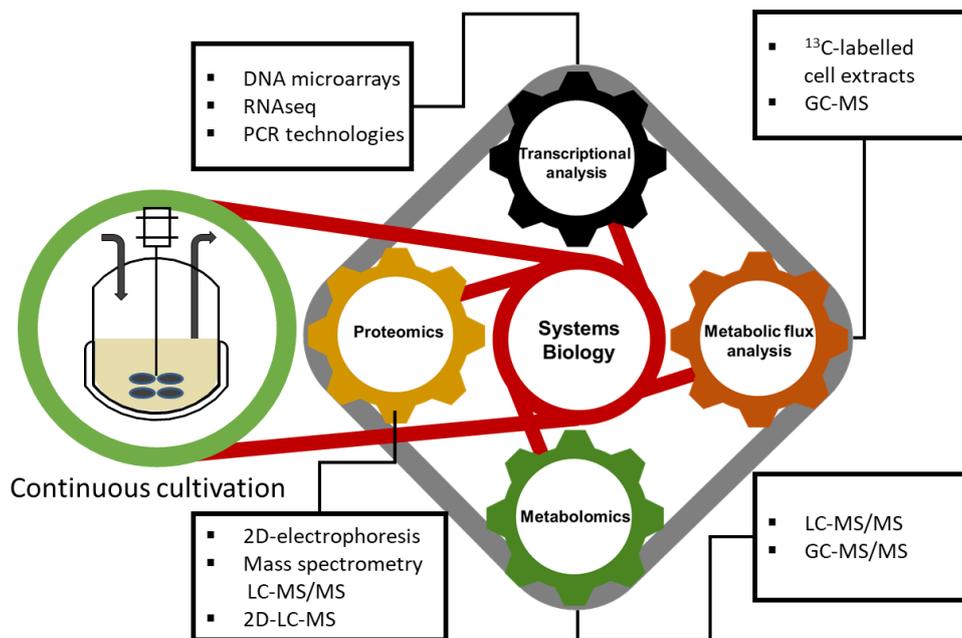


Fig. 1.5. Los cultivos en continuo como fuente de información para la biología de sistemas, la cual permite un profundo entendimiento de la fisiología celular (Nieto-Taype *et al.*, 2019).

En la actualidad, las tendencias en la optimización de bioprocesos apuntan a generar metodologías específicas que se adapten a casos particulares para cada clon o biorreactor (Looser *et al.*, 2015). Por lo tanto, en base al conocimiento detallado de la fisiología celular (biología de sistemas) y de las cinéticas del bioproceso, se podrían diseñar estrategias derivadas de la interpretación de la información previa (diseño

racional), las cuales serían útiles durante el proceso de migración del laboratorio a la industria. De esta manera, se podría proceder de manera exitosa y robusta al cambio desde modos de operación más convencionales, como lo son los cultivos en *fed-batch*, hasta la optimización de procesos en continuo a gran escala.

1.5.2 Los cultivos en *fed-batch* como un modo de operación enfocado a las aplicaciones industriales

El modo de operación en semicontinuo, más conocido como *fed-batch*, corresponde a un tipo de fermentación en la que uno o varios nutrientes son añadidos al biorreactor (de forma intermitente o continua), de modo que los productos se mantienen dentro del reactor hasta la finalización del bioproceso. Por lo tanto, en dichos cultivos el producto de interés es purificado al final del proceso. En ese sentido, el volumen del cultivo, así como la biomasa, se van incrementando durante el curso de la fermentación.

Su primera aplicación fue descrita en 1954 en la fermentación de la levadura *S. cerevisiae* para evitar la formación de etanol, un subproducto propio del metabolismo *Crabtree* positivo. Para ello, se realizó la alimentación de glucosa en *fed-batch* para, de ese modo, mantenerla en concentraciones limitantes y así evitar la formación de etanol (Sindhu *et al.*, 2016). La eficiencia que ha demostrado este modo de operación ha permitido extender su aplicación y convertirlo actualmente en el más frecuente en las fermentaciones industriales (Biol *et al.*, 2002; Bodizs *et al.*, 2007).

Durante su aplicación, los cultivos en *fed-batch*, han mostrado ventajas sobre otros modos de operación (básicamente *batch* y continuo), tales como: permitir ejercer mayor control sobre parámetros clave de bioproceso, evitar la formación de sub-productos y efectos de represión por catabolito debido a la presencia limitante de sustrato para la formación de producto. Además, al ser cultivos que alcanzan altas densidades celulares, pueden llegar a generar también altas concentraciones de proteína recombinante. Sin embargo, existen ciertas desventajas relacionadas a la necesidad de una gran experiencia por parte del operador durante el establecimiento y desarrollo del bioproceso, además de la necesidad de una caracterización previa del microorganismo a ser utilizado para entender sus requerimientos respecto a la fisiología y productividad.

Generalmente, los cultivos en semicontinuo (*fed-batch*) presentan dos fases claramente definidas: Una fase discontinua o de *batch*, donde la cepa es inoculada dentro del reactor que cuenta con un medio rico en nutrientes para promover la generación de biomasa a la máxima velocidad de crecimiento. Una vez el sustrato se haya agotado se procederá a continuar con la fase de alimentación (*feeding*) para abastecer al sistema de todos los nutrientes necesarios para la actividad celular (Mears, Stocks, Albaek, *et al.*, 2017).

En el caso concreto de *P. pastoris* se ha observado que durante la implementación de cultivos en modo de operación en *fed-batch*, las diferentes fases del cultivo pueden variar dependiendo del tipo estrategia operacional seleccionada, la cual suele ser dependiente del sistema de expresión utilizado. Mientras que, para sistemas de expresión constitutivos, los cultivos en *fed-batch* mantienen la operación las dos fases previamente descritas (Çalik *et al.*, 2015), para el caso de sistemas inducibles dependientes de metanol como el P_{AOX1} la fase de *fed-batch* es usualmente precedida por una fase de transición que permitirá desreprimir el promotor y activar el metabolismo celular para el cambio de sustrato en la fase de alimentación (*feeding*) donde se utilizará metanol como inductor y nueva fuente de carbono (Liu *et al.*, 2019).

El método de adición durante la fase de alimentación cobra importancia debido a que ejerce un control directo sobre los parámetros de bioproceso y producción tales como: la velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de formación de producto, subproductos, consumo de oxígeno, etc. La mecánica de adición puede ser mediante el uso de pulsos, o de forma continua a través del uso de diversos perfiles de adición; constantes, lineales, exponenciales o inclusive perfiles complejos basados la aplicación de métodos de control (control adaptativo, modelos de control predictivo, control Fuzzy, etc.) (Liu, 2017; Mears, Stocks, Sin, *et al.*, 2017). Finalmente, la elección de una estrategia específica depende tanto de los objetivos de control deseados (maximizar concentración de producto, minimizar formación de subproductos, maximizar rendimientos de proceso, etc.) como de las características intrínsecas propias de la factoría celular y de la propia proteína expresada (Potvin *et al.*, 2012; Mears, Stocks, Sin, *et al.*, 2017).

Para el caso específico de la factoría celular *P. pastoris*, se han descrito ampliamente el uso de diferentes estrategias de alimentación empleando perfiles de los tipos que se muestran a continuación (Fig. 1.6):

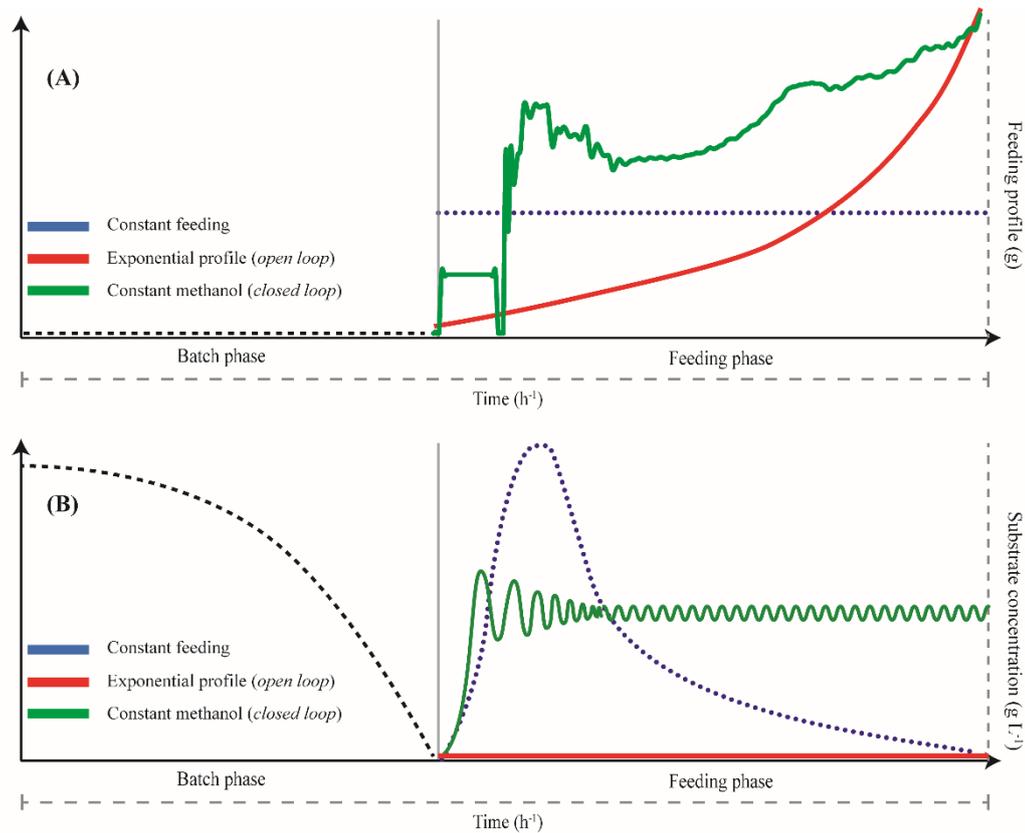


Fig. 1.6. (A) Principales perfiles de alimentación utilizados en *P. pastoris* para cultivos en *fed-batch* mediante el uso de perfiles de alimentación: constante (azul), exponencial (rojo) y mantenimiento de la concentración de metanol constante mediante un control en lazo cerrado (*closed loop*) (verde). (B) Concentración de sustrato presente durante la implementación de los perfiles previamente detallados.

- a) **Constante:** es considerado el método más simple de adición. Se ha utilizado tanto para sistema de expresión inducibles como constitutivos, el cual consiste en fijar un determinado caudal que se mantendrá inamovible durante toda la fermentación (Müller *et al.*, 2016; Vogl, Sturmberger, *et al.*, 2018). La principal desventaja de este tipo de cultivos es que no ejerce ningún tipo de control sobre los parámetros cinéticos como la μ la cual muestra una gran variabilidad al disminuir de forma exponencial durante la fase de alimentación (Looser *et al.*, 2015).
- b) **Exponencial:** a través de un control en lazo abierto (*open-loop*) mediante el uso de un perfil predefinido (el cual no requiere un control *on-line*). Entre los perfiles de adición, el exponencial ha sido el más utilizado en cultivos *fed-batch* cuando se quiere proceder en condiciones de limitación de carbono. Su mecanismo de control está basado en las ecuaciones de balance de materia, permitiendo mantener una velocidad específica de crecimiento constante fijada por el operador. Esta estrategia muestra buenos resultados siempre que el bioproceso no sufra

perturbaciones, ya que no es capaz de corregir la adición en respuesta a una posible perturbación del sistema (Mears, Stocks, Sin, *et al.*, 2017). El uso de esta estrategia ha sido ampliamente reportado con cepas recombinantes utilizando promotores constitutivos como *GAP* o *TH11* (Çalik *et al.*, 2015; Garcia-Ortega *et al.*, 2016; Landes *et al.*, 2016); aunque se ha reportado también ser útil con promotores inducibles como *AOXI* (Brunel *et al.*, 2004; Potgieter *et al.*, 2009; Barrigón *et al.*, 2013).

- c) **Control en lazo cerrado** (*closed-loop*): este tipo de control permite mantener constante un determinado parámetro a través de su cuantificación directa o indirecta en tiempo real durante el bioproceso (Valero, 2013). Las estrategias de control pueden ir desde las más clásicas y sencillas en retroalimentación (feedback P, PI, PID) hasta adaptativas o predictivas con la necesidad de utilizar algoritmos de estimación y optimización *on-line*. (Mears, Stocks, Albaek, *et al.*, 2017).

Ha demostrado ser útil en el desarrollo de fermentaciones en *fed-batch* manteniendo constante el oxígeno disuelto (DO-stat) (Ferreira *et al.*, 2012) y también ser efectivo para llevar a cabo cultivos en condiciones no limitantes de metanol (MNLFB), manteniendo una concentración residual constante, los cuales se han establecido como una alternativa eficaz frente a los cultivos en condiciones limitantes de metanol (*open-loop* o MLFB (Barrigón *et al.*, 2013; Ponte *et al.*, 2018). La principal ventaja ofrecida por estos tipos de control es su capacidad de adaptación y reacción a perturbaciones externas. No obstante, hay que ser consciente que para su aplicación muchas veces se requiere de una mayor complejidad en el sistema de control y una profunda caracterización de la factoría celular utilizada, la cual suele ser específica para cada bioproceso en particular.

1.5.3 Estrategias de *fed-batch* basadas en la explotación de la fisiología de *P. pastoris*

El creciente conocimiento relacionado a la caracterización fisiológica y de bioproceso en la factoría celular *P. pastoris* ha permitido abrir nuevos horizontes para el desarrollo de novedosas estrategias de operación en cultivos en modo de operación en *fed-batch*.

Un claro ejemplo es el observado en la optimización de bioprocesos utilizando cepas recombinantes bajo el control del promotor *GAP*. Teniendo en cuenta el origen de este promotor en la enzima gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa (propia del ciclo de la glicólisis), se ha observado que en la mayoría de casos la velocidad de formación de producto suele estar positivamente influenciada con la velocidad específica de crecimiento (μ), lo cual se ha determinado en cultivos en *fed-batch* haciendo uso de un perfil exponencial a una μ constante (García-Ortega *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha expuesto que bajo condiciones restrictivas tanto de fuente de carbono (*carbon-starving*) (García-Ortega *et al.*, 2016) como de oxígeno (*hypoxia*) (Baumann *et al.*, 2008) la afectación ejercida sobre el ciclo de la glicólisis se ve reflejada en la producción de proteínas recombinantes (García-Ortega *et al.*, 2019).

Por otro lado, el conocimiento de la fisiología en términos de cinética de producción, consumo de sustratos y crecimiento en el caso del promotor *AOXI* también ha mostrado ser de gran interés. Por ejemplo, cuando el metanol es utilizado como inductor y única fuente de carbono (Ponte *et al.*, 2018) o se utilizan sustratos mixtos (*co-feeding*) se ha mostrado útil para incrementar la eficiencia del bioproceso y tener un mayor control sobre el uso del inductor (metanol) (Arnau *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2019; Wurm and Spadiut, 2019).

Aunque este tipo de estrategias han sido desarrolladas con promotores clásicos, su extensión sobre nuevos promotores de naturaleza constitutiva, inducible o desreprimible permitiría abrir nuevos horizontes en el desarrollo de nuevas estrategias de operación en cultivos en *fed-batch*, para lo cual será necesario una caracterización de los clones productores (utilizando cultivos preferentemente en quimiostato). Así, en base a un conocimiento previo de su fisiología y de los parámetros de bioproceso que se encuentren vinculados a las cinéticas de producción se pueda dar paso a la propuesta de nuevas estrategias basadas en un diseño racional.

1.6 Las lipasas como herramientas de aplicación biotecnológica

1.6.1 Catalizadores y biocatalizadores

Los catalizadores pueden ser definidos como moléculas que reducen la magnitud de la barrera energética (energía de activación) requerida para una determinada reacción bio/química, lo cual en términos termodinámicos corresponde a una reducción de la energía libre requerida para esta fase de la reacción (Fig. 1.7); durante dicho proceso el catalizador no es consumido ni alterado. En las reacciones químicas propias del metabolismo celular, los biocatalizadores necesarios para sostener el ritmo de la vida son denominados enzimas, las cuales además de ser específicas para cada reacción en diferentes funciones celulares, también pueden dar respuesta a los actuales requerimientos de la química verde (*green chemistry*) en la búsqueda de catalizadores amigables y compatibles con el medio ambiente.

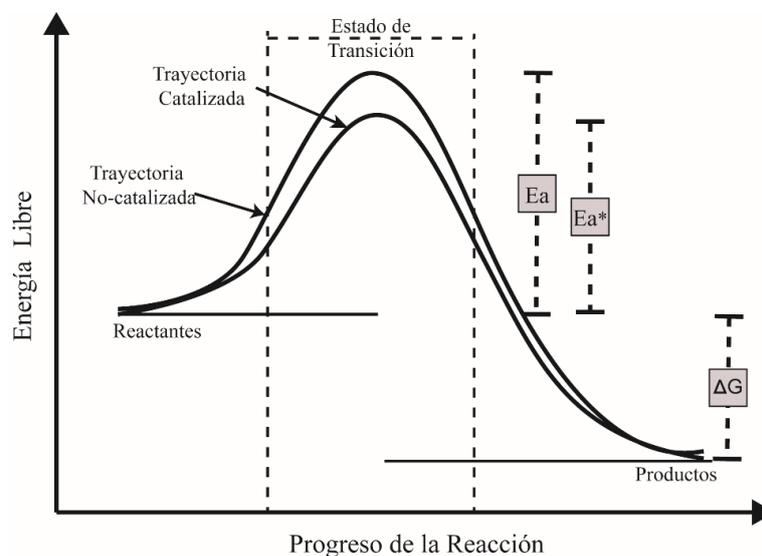


Fig. 1.7. Mecanismo de catálisis. E_a y E_{a^*} corresponden a la energía de activación durante reacciones sin y con la presencia de catalizador respectivamente. ΔG es el cambio de energía libre durante la reacción (Illanes, 2008).

Aunque la mayoría de enzimas son proteínas, es importante mencionar que también las hay de otra naturaleza como las ribozimas (*ribozymes*) (Robinson, 2015). La mayoría de las enzimas son proteínas globulares de tamaño variable, las cuales están conformadas por cadenas polipeptídicas que van de 100 a 2000 aminoácidos unidas por

enlaces peptídicos (estructura primaria), que a su vez se pliegan y doblan para formar estructuras tridimensionales (estructuras, secundaria y terciaria) necesarias para otorgarles funcionalidad.

Según la función realizada, las enzimas pueden clasificarse en seis grupos. Basados en las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) a cada tipo de enzima se le otorga un número EC de 4 dígitos. De los cuales el primero corresponde a la clase de actividad enzimática que lleva a cabo tal como se describe en la tabla 3, mientras que los siguientes dígitos corresponden a las subclases y finalmente el último número a la serie aplicada para nombrar la enzima concreta en función al orden cronológico en que fue añadida a la lista. (Comisión de Enzimas) (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2012).

Tabla 3. Clasificación de las enzimas. Principales clases de enzimas según el sistema EC

Clase	Nombre	Reacción catalizada	Ejemplo
EC 1	Oxidoreductasas	Catalizan reacciones de oxidación y reducción.	Oxididasas
EC 2	Transferasas	Transfieren grupos funcionales de una molécula a otra.	Transaminasas
EC 3	Hidrolasas	Formación de dos productos a partir de un sustrato.	Lipasas
EC 4	Liasas	Adición o remoción de grupo no hidrolítica.	Descarboxilasas
EC 5	Isomerasas	Reestructuración intramolecular.	Isomerasas
EC 6	Ligasas	Unión de dos moléculas por la síntesis de enlaces C-O, C-S, C-N o C-C.	Sintetasas

1.6.2 Lipasas

De entre la gran variedad de enzimas descritas, las lipasas han adquirido gran interés debido a sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. Las lipasas, son enzimas definidas como triacilglicerol lipasas (EC. 3.1.1.3), las cuales corresponden a serinohidrolasas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster presentes en los triglicéridos (insolubles) para producir ácidos grasos libres y glicerol como productos finales, si bien también se pueden obtener los productos intermedios de la reacción diglicéridos y/o monoglicéridos en medio acuoso (Fig. 1.8). Su actividad sobre triglicéridos permite

diferenciarlas claramente de las esterasas (E.C. 3.1.1.13), las cuales, aunque realizan una reacción similar, hidrolizan esterol ésteres como principal sustrato siempre que éste sea soluble en medio acuoso. Sin embargo, se ha descrito que una gran mayoría de esterol esterasas muestran a su vez actividad lipasa (Barriuso *et al.*, 2016).

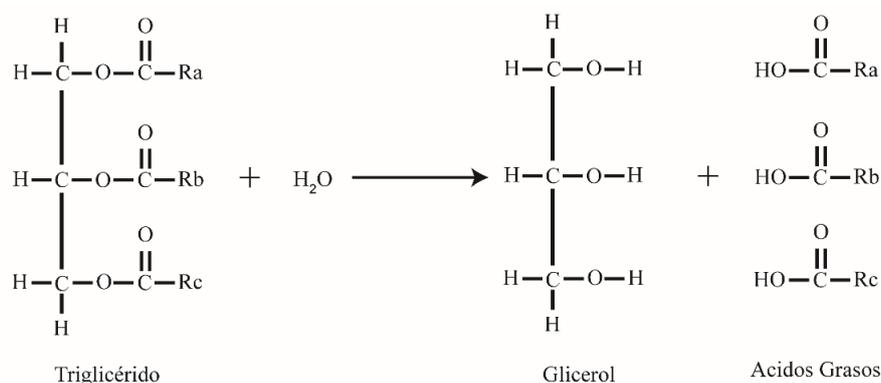


Fig. 1.8. Esquema de reacción natural de las lipasas. Hidrólisis de enlaces éster de triglicéridos dando como resultados glicerol y ácidos grasos (Díaz *et al.*, 2014).

Aunque la principal actividad de las lipasas está relacionada con reacciones de hidrólisis, se ha observado que también son capaces de realizar reacciones de síntesis y transesterificación en medios de reacción no acuosos con baja presencia de agua (Casas-Godoy *et al.*, 2018). Esta característica ha ampliado su aplicación en diferentes campos de la industria (papelera, alimentación animal, textil, detergentes, cosmética, farmacéutica, tratamiento de aguas y biocombustibles) para la síntesis de diversos compuestos y su aplicación en procesos biotecnológicos como se observa en la Fig. 1.9 (Filho *et al.*, 2019).

El uso industrial de estas enzimas ha generado la necesidad de nuevas lipasas con mejor estabilidad y que sean capaces de catalizar reacciones con nuevos sustratos en condiciones específicas. En ese sentido, el conocimiento de la arquitectura tridimensional de las lipasas ha mostrado ser una herramienta crucial no sólo para este propósito, sino también para la caracterización y clasificación de las mismas.

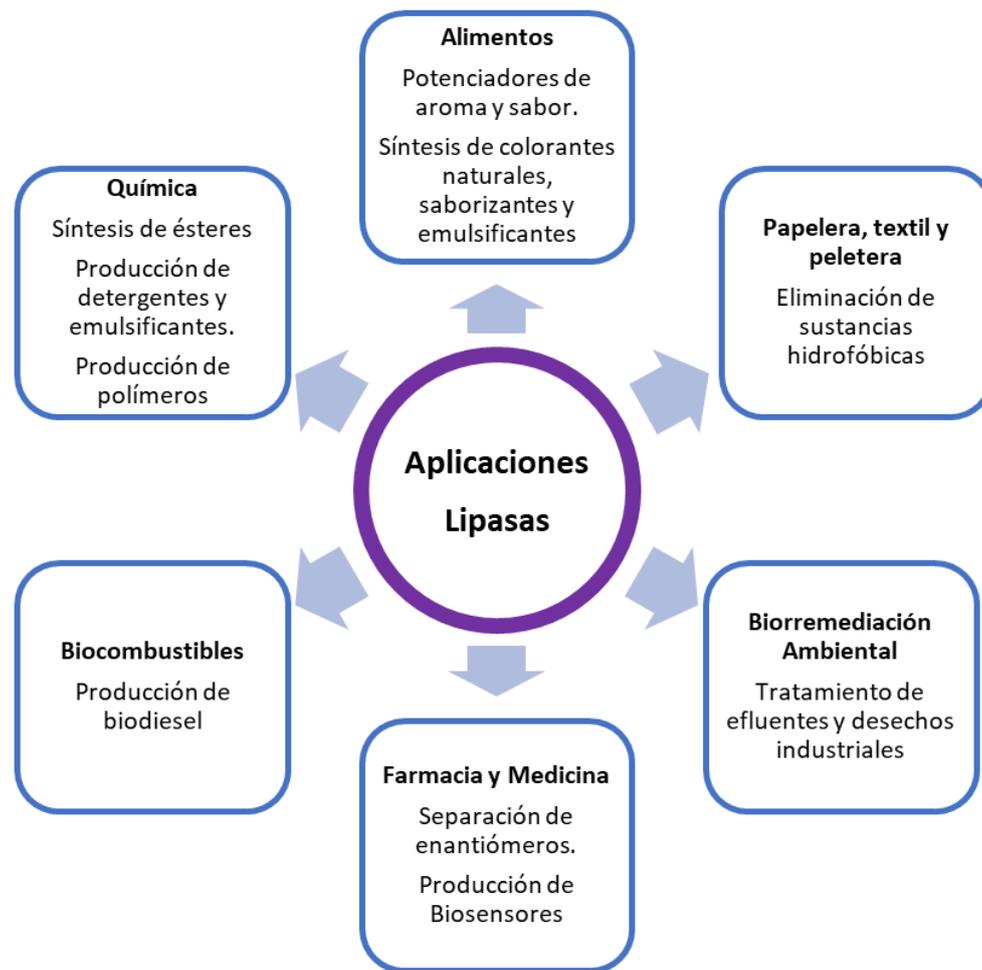


Fig. 1.9. Resumen de las principales aplicaciones industriales de las lipasas (Filho *et al.*, 2019).

A nivel estructural las lipasas muestran un plegamiento muy conservado conocido como ensamblaje α/β hidrolasa el cual contiene los residuos correspondientes a la triada catalítica (serina, histidina y ácido aspártico/glutámico) y a la cavidad oxianiónica (*oxyanion hole*), una especie de bolsillo en el sitio activo involucrado en la estabilización de la reacción intermediaria (Barriuso *et al.*, 2016; Ken Ugo *et al.*, 2017). Además, se ha visto que su actividad es regulada por la presencia de una tapa (*lid*) que permite el acceso al centro activo mediante un mecanismo conocido como activación interfacial (Filho *et al.*, 2019).

Las lipasas son enzimas producidas por una gran variedad de plantas, animales y microorganismos. En específico, las lipasas microbianas han atraído la atención industria, debido su versatilidad para trabajar en un amplio rango de temperaturas y pH, además de

presentar estabilidad frente a solventes orgánicos, y poseer una excepcional especificidad (quimio-, regio- y enantioselectividad) (Geoffry and Achur, 2018). Destacar que las lipasas de origen fúngico (hongos y levaduras) cuentan con un gran número de aplicaciones industriales conocidas siendo los organismos productores de mayor interés los correspondientes a los géneros: *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Candida*, y *Penicillium* (Singh and Mukhopadhyay, 2012).

Las lipasas pertenecientes a las levaduras del género *Candida*, en específico las pertenecientes a *C. rugosa* y *C. antártica* han sido ampliamente caracterizadas y expresadas debido a su gran potencial uso industrial y/o comercial (Hwang *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015; Sarmah *et al.*, 2018). A continuación, en los siguientes apartados se llevará a cabo una descripción de cada una de estas enzimas.

1.6.2.1 Lipasas de *Candida rugosa*

Candida rugosa, también conocida anteriormente como *Candida cylindracea*, es un hemiascomiceto unicelular de tipo de reproducción no esporogénica (Ferrer *et al.*, 2001), que cuenta con el reconocimiento de organismo GRAS (Li *et al.*, 2016), la cual es capaz de secretar una variedad de lipasas con aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y energética (Kourist *et al.*, 2011; Piamtongkam *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2016; Trbojević Ivić *et al.*, 2017). En términos generales, las diferentes lipasas de *C. rugosa* (CrI) corresponden a un grupo de isoenzimas (glicoproteínas) con un peso molecular comprendido entre 57-61 kDA y un rango del punto isoeléctrico entre 4.5-5.7 (Barriuso *et al.*, 2016). Por otra parte, en relación a su estructura, además de presentar una tapa como la gran mayoría de lipasas, éstas cuentan con un túnel (*tunnel*) involucrado en el reconocimiento del sustrato antes de llegar al centro activo (característico de las lipasas tanto de *C. rugosa* como de *Geotrichum candidum*) (Domínguez De María *et al.*, 2006).

Durante los primeros estudios con extractos extracelulares de *C. rugosa*, se observó una gran dificultad en la reproducibilidad en la caracterización de las reacciones bio-catalíticas, lo cual generó las primeras hipótesis que la actividad lipásica no sólo reside en una enzima en concreto, sino que es parte de una mezcla de diferentes isoenzimas presentes (Barriuso *et al.*, 2016).

En la actualidad se ha establecido la presencia de hasta 8 genes responsables de la codificación de diferentes lipasas (*CRL1-CRL7(8)*) (Lotti *et al.*, 1993; Brocca *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2010), las cuales cuentan con 60-70% de homología en la secuencia genética (Chang, Lee, *et al.*, 2006). Sin embargo, sólo se han podido purificar y caracterizar bioquímicamente 5 isoformas (*CRL1-CRL5*) (Kuo *et al.*, 2015). A pesar de la homología observada a nivel genético, a nivel bioquímico se observa que pequeñas variaciones en la secuencia aminoacídica propia de las regiones como la estructura de la tapa (*lid*) y del *oxyanion hole* pueden afectar al comportamiento biocatalítico, debido a que ambas regiones son cruciales durante el reconocimiento e interacción con el sustrato, tal como se ha observado en las estructuras cristalográficas de las lipasas Crl1-Crl3 (Domínguez De María *et al.*, 2006).

Aunque los extractos crudos de Crl son utilizados en diversas aplicaciones biocatalíticas, éstos muestran una gran variabilidad en sus resultados y eficiencia, lo que ha hecho necesario separar cada isoforma para mejorar su aplicabilidad y potencialidad industrial, así se ha observado un *downstream* muy ineficiente debido a la gran homología de las diferentes isoenzimas (Akoh *et al.*, 2004; López *et al.*, 2004). A nivel comercial, se sabe que las lipasas de *C. rugosa* corresponden a una mezcla de las isoenzimas Crl1-Crl3 (Sigma) de las cuales Crl1 se encuentra en un 73%, mientras que Crl2 en un 8% y finalmente Crl3 en un 19%, Estas proporciones se mantienen en formulados de otras distribuidoras como Roche ó Amano (Domínguez De María *et al.*, 2006). Por lo tanto, la expresión heteróloga surge como una poderosa alternativa frente a la purificación convencional. Así, mediante el uso de la factoría celular *P. pastoris* se han podido expresar las lipasas Lip1-Lip5 y LipJ08 de forma aislada (Vanleeuw *et al.*, 2019). En particular la lipasa 1 de *C. rugosa* (Crl1) (Fig. 1.10), la cual cuenta con un peso molecular de 60 kDa y cuyo punto isoeléctrico está aproximadamente a pH= 4.7, ha cobrado gran importancia por ser el componente mayoritario en los extractos celulares, generando un gran interés de estudio con fines investigación científica y aplicaciones industriales (Li *et al.*, 2016; Hao *et al.*, 2019).

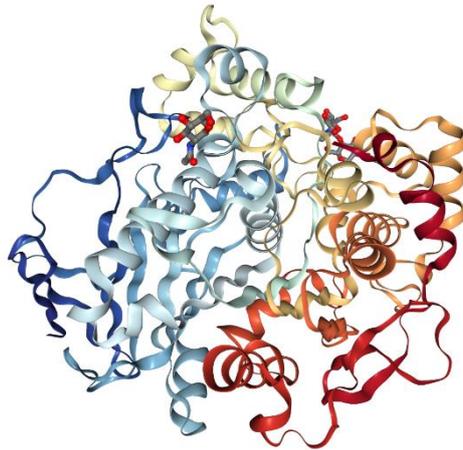


Fig. 1.10. Estructura tridimensional de la lipasa 1 de *C. rugosa* Cr11. Imagen obtenida de la base de datos PDB, ID: 1CRL.

1.6.2.2 Lipasas de *Candida antarctica*

Como su nombre sugiere, el organismo productor de estas lipasas fue aislado en la Antártida, con el objetivo de encontrar enzimas con propiedades particulares que les otorgaran la capacidad de poder ejercer su función en condiciones extremas. Para la levadura *Candida antarctica* (*Pseudozyma antarctica*) se ha descrito la presencia de dos diferentes lipasas conocidas como A y B (CalA y CalB) (Kirk and Christensen, 2002).

Por un lado, se ha descrito la CalA como una enzima α/β hidrolasa dependiente de calcio compuesta por 431 aminoácidos, un peso de 45kDa y un punto isoeléctrico de $\text{pH} = 7.5$ (Domínguez De María *et al.*, 2005). Es considerada como una de las enzimas de mayor termoestabilidad, capaz de trabajar a temperaturas superiores a 90°C , una característica paradójica para un microorganismo que crece a muy bajas temperaturas. A pesar de ello, CalB ha demostrado ser más versátil que CalA al ser capaz de aceptar un mayor rango de sustratos, así como, de exhibir una alta selectividad en diversas reacciones (Lima *et al.*, 2019). Como características generales de esta lipasa, CalB está constituida por 317 aminoácidos, con un peso molecular de 33kDa y un punto isoeléctrico de 6 (Ortiz *et al.*, 2019). A nivel estructural CalB (Fig. 1.11) cuenta con la misma estructura general α/β hidrolasa que CalA. Sin embargo, existe una gran discusión con respecto al mecanismo de reacción, ya que diversos autores sostienen que CalB carece de una tapa (*lid*) encargada de la activación interfacial (Lima *et al.*, 2019), mientras que otros autores aducen que esta función se observa en las cadenas $\alpha 5$ y $\alpha 10$; de las cuales la $\alpha 5$

muestra una conformación abierta y semicerrada como una pequeña *lid*, mientras que la $\alpha 10$ actúa como un elemento de activación (Ganjalkhany *et al.*, 2012; Zisis *et al.*, 2015).

CalB es considerada una enzima altamente enantioselectiva y un eficiente catalizador utilizado en reacciones como resoluciones cinéticas, aminólisis, esterificación en medios sin presencia de solventes o en presencia de solventes orgánicos (Kundys *et al.*, 2018). Dichas características han permitido que CalB sea una de las lipasas más utilizadas en la industria farmacéutica, química y alimentaria. Esto se refleja en su producción a nivel industrial por grandes compañías productoras de enzimas como *Novozymes*, cuyo producto *Novozymes 435*, el cual corresponde a un formulado inmovilizado en la resina *Lewatit VP OC 1600* (Ortiz *et al.*, 2019), es uno de sus productos más vendidos. Debido a las potenciales aplicaciones previamente descritas, esta lipasa se ha transformado en la diana de investigación de múltiples trabajos que buscan mejorar sus características y los métodos de producción en organismos heterólogos (Vogl *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2019; Rantasalo *et al.*, 2019).

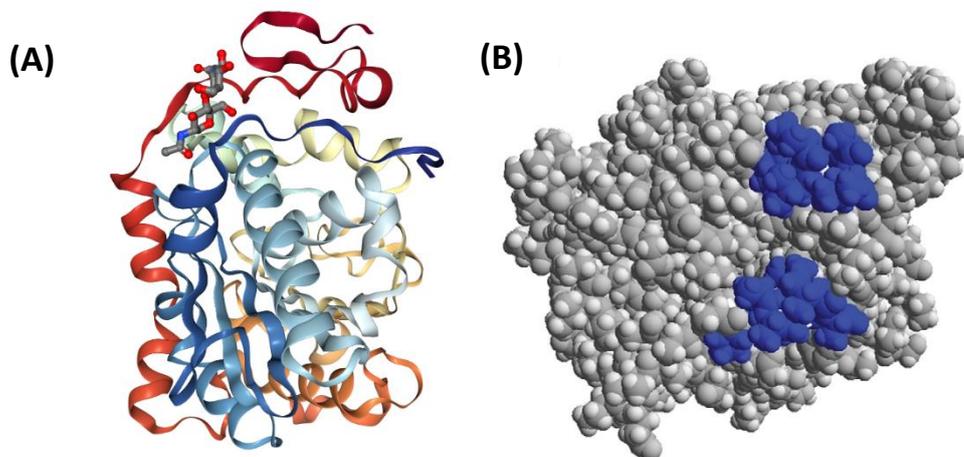


Fig. 1.11. Estructura tridimensional de la lipasa B de *C. antarctica* CalB. (A) Imagen obtenida de la base de datos PDB, ID: 1TCA. (B) estructura abierta de las cadenas $\alpha 5$ (arriba) y $\alpha 10$ (abajo) (Ganjalkhany *et al.*, 2012).

P. pastoris ha demostrado ser una excelente plataforma de expresión heteróloga de diferentes enzimas, como las lipasas. De esta manera, la producción recombinante de lipasas de interés industrial tales como Cr11 y CalB, las cuales han sido objeto de estudio en múltiples trabajos, ha permitido lograr grandes avances en el uso y desarrollo de esta factoría celular. Por ejemplo, para el caso de Cr11 se tuvo que hacer uso de la optimización

de la secuencia (mediante mutagénesis por PCR o mediante el uso de genes sintéticos) previo al clonaje (Chang *et al.*, 2005; Chang, Lee, *et al.*, 2006) debido a que *C. rugosa* ha mostrado presentar un código genético no convencional, en concreto el codón CTG (codificado para serina en lugar de leucina). Una vez solucionado este problema se ha podido expresar exitosamente dicha proteína. Una vez conseguida la expresión de Cr11, se han llevado a cabo estudios para mejorar las condiciones de producción tanto en cultivos en matraz (Chang, Shieh, *et al.*, 2006) como en biorreactor en modo de operación *fed-batch* tanto para el P_{AOXI} (Li *et al.*, 2016) como para el P_{GAP} (Zhao *et al.*, 2008). Cabe destacar que para el caso del promotor *GAP* se ha llegado inclusive a realizar el escalado (*scale-up*) del bioproceso en fermentadores de hasta 800 L. Sin embargo, pocos estudios aparte de los mencionados han sido llevados a cabo con esta proteína.

Por otra parte, la lipasa CalB ha demostrado ser una excelente proteína de referencia industrial (*reporter*) durante el desarrollo de cepas mejoradas de *P. pastoris* a través del uso de la ingeniería de cepas, ya sea mediante la implementación de tecnologías CRISPR/Cas9 (Weninger *et al.*, 2018), el desarrollo de nuevos promotores (Vogl *et al.*, 2016; Vogl, Kickenweiz, *et al.*, 2018), y la aplicación de la ingeniería metabólica (Krainer *et al.*, 2012). En paralelo, se ha llevado a cabo la optimización del bioproceso durante la implementación de cultivos en fermentador tanto en quimiostato (de Macedo Robert *et al.*, 2019) como en *fed-batch* (Looser *et al.*, 2017; Raschmanová *et al.*, 2019).

En base a lo descrito en la presente introducción, la tesis doctoral estará enfocada en la optimización del uso de la factoría celular *P. pastoris* para la producción heteróloga de enzimas de interés industrial como los son las lipasas Cr11 y CalB. Para ello, se hará uso de dos grandes enfoques complementarios entre sí: El uso de técnicas de ingeniería de bioproceso para realizar el diseño racional de las estrategias de operación y la ingeniería de cepas a través de la caracterización de clones con diferente dosis génica y/o que utilicen diferentes promotores que permitan optimizar la producción recombinante.

1.7 Referencias

- Adamberg, K., Valgepea, K., and Vilu, R. (2015) Advanced continuous cultivation methods for systems microbiology. *Microbiol (United Kingdom)* **161**: 1707–1719.
- Adelantado, N., Tarazona, P., Grillitsch, K., García-Ortega, X., Monforte, S., Valero, F., *et al.* (2017) The effect of hypoxia on the lipidome of recombinant *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **16**: 86.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., and Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 5301–5317.
- Akoh, C.C., Lee, G.C., and Shaw, J.F. (2004) Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. *Lipids* **39**: 513–526.
- Arnau, C., Casas, C., and Valero, F. (2011) The effect of glycerol mixed substrate on the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system. *Biochem Eng J* **57**: 30–37.
- Ata, Ö., Prielhofer, R., Gasser, B., Mattanovich, D., and Çalık, P. (2017) Transcriptional engineering of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for improved heterologous protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* **114**: 2319–2327.
- Aw, R., Barton, G.R., and Leak, D.J. (2017) Insights into the prevalence and underlying causes of clonal variation through transcriptomic analysis in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**: 5045–5058.
- Aw, R. and Polizzi, K.M. (2013) Can too many copies spoil the broth? *Microb Cell Fact* **12**: 128.
- Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A.A., Hoseinpoor, R., *et al.* (2019) Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Mol Biotechnol* **61**: 365–384.
- Barrero, J.J., Casler, J.C., Valero, F., Ferrer, P., and Glick, B.S. (2018) An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **17**: 161.
- Barrigón, J.M., Montesinos, J.L., and 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? *Biochem Eng J* **75**: 47–54.
- Barriuso, J., Vaquero, M.E., Prieto, A., and Martínez, M.J. (2016) Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. *Biotechnol Adv* **34**: 874–885.
- Baumann, K., Maurer, M., Dragosits, M., Cos, O., Ferrer, P., and Mattanovich, D. (2008) Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng* **100**: 177–183.
- Betancur, M.O., Reis, V.C.B., Nicola, A.M., De Marco, J.L., de Moraes, L.M.P., and Torres, F.A.G. (2017) Multicopy plasmid integration in *Komagataella phaffii*

- mediated by a defective auxotrophic marker. *Microb Cell Fact* **16**: 99.
- Birol, G., Ündey, C., and Çınar, A. (2002) A modular simulation package for fed-batch fermentation: penicillin production. *Comput Chem Eng* **26**: 1553–1565.
- Bodizs, L., Titica, M., Faria, N., Srinivasan, B., Dochain, D., and Bonvin, D. (2007) Oxygen control for an industrial pilot-scale fed-batch filamentous fungal fermentation. *J Process Control* **17**: 595–606.
- Brocca, S., Grandori, R., Breviario, D., and Lotti, M. (1995) Localization of lipase genes on *Candida rugosa* chromosomes. *Curr Genet* **28**: 454–457.
- Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, H., Moulin, G., Bigey, F., and Dubreucq, E. (2004) High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* **111**: 41–50.
- Bull, A.T. (2010) The renaissance of continuous culture in the post-genomics age. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**: 993–1021.
- Çalik, P., Ata, Ö., Güneş, H., Massahi, A., Boy, E., Keskin, A., *et al.* (2015) Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochem Eng J* **95**: 20–36.
- Cámara, E., Landes, N., Albiol, J., Gasser, B., Mattanovich, D., and Ferrer, P. (2017) Increased dosage of *AOX1* promoter-regulated expression cassettes leads to transcription attenuation of the methanol metabolism in *Pichia pastoris*. *Sci Rep* **7**: 44302.
- Cankorur-Cetinkaya, A., Narraido, N., Kasavi, C., Slater, N.K.H., Archer, D.B., and Oliver, S.G. (2018) Process development for the continuous production of heterologous proteins by the industrial yeast, *Komagataella phaffii*. *Biotechnol Bioeng* **115**: 2962–2973.
- Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., and Sandoval, G. (2018) Lipases: An Overview. In, *Methods in Molecular Biology*, pp. 3–38.
- Çelik, E. and Çalık, P. (2012) Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv* **30**: 1108–1118.
- Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Ilgen, C., and Cregg, J.M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotech* **13**: 329–332.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 45–66.
- Chang, C.H., Hsiung, H.A., Hong, K.L., and Huang, C.T. (2018) Enhancing the efficiency of the *Pichia pastoris* *AOX1* promoter via the synthetic positive feedback circuit of transcription factor Mxr1. *BMC Biotechnol* **18**: 81.
- Chang, S. W., Lee, G.-C., and Shaw, J.-F. (2006) Codon optimization of *Candida rugosa* lip1 gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *J Agric Food Chem* **54**: 815–822.
- Chang, S. W., Shieh, C.J., Lee, G.C., Akoh, C.C., and Shaw, J.F. (2006) Optimized growth

- kinetics of *Pichia pastoris* and recombinant *Candida rugosa* LIP1 production by RSM. *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**: 28–40.
- Chang, S.W., Shieh, C.J., Lee, G.C., and Shaw, J.F. (2005) Multiple mutagenesis of the *Candida rugosa* LIP1 gene and optimum production of recombinant LIP1 expressed in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 215–224.
- Cooney, C.L. (1979) Continuous culture of microorganisms: an overview and perspective. *Ann N Y Acad Sci* **326**: 295–314.
- Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P., and Stillman, C.A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* **9**: 1316–1323.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S., and Raschke, W.C. (1993) Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol* **11**: 905–910.
- Dagar, V.K. and Khasa, Y.P. (2018) Combined effect of gene dosage and process optimization strategies on high-level production of recombinant human interleukin-3 (hIL-3) in *Pichia pastoris* fed-batch culture. *Int J Biol Macromol* **108**: 999–1009.
- Delic, M., Valli, M., Graf, A.B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2013) The secretory pathway: Exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 872–914.
- Delroisse, J.M., Dannau, M., Gilsoul, J.J., El Mejdoub, T., Destain, J., Portetelle, D., *et al.* (2005) Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **42**: 286–294.
- Díaz, G.C., Tapanes, N. de la C.O., Câmara, L.D.T., and Aranda, D.A.G. (2014) Glycerol conversion in the experimental study of catalytic hydrolysis of triglycerides for fatty acids production using Ni or Pd on Al₂O₃ or SiO₂. *Renew Energy* **64**: 113–122.
- Domínguez De María, P., Carboni-Oerlemans, C., Tuin, B., Bargeman, G., Van Der Meer, A., and Van Gemert, R. (2005) Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. *J Mol Catal B Enzym* **37**: 36–46.
- Domínguez De María, P., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J. V., and Alcántara, A.R. (2006) Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol Adv* **24**: 180–196.
- Dragosits, M., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2011) Induction and measurement of UPR and osmotic stress in the yeast *Pichia pastoris*. In, *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 165–188.
- Fernandes, B.D., Mota, A., Teixeira, J.A., and Vicente, A.A. (2015) Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: Approaches, applications and future trends. *Biotechnol Adv* **33**: 1228–1245.
- Ferreira, A.R., Ataíde, F., von Stosch, M., Dias, J.M.L., Clemente, J.J., Cunha, A.E., and Oliveira, R. (2012) Application of adaptive DO-stat feeding control to *Pichia pastoris* X33 cultures expressing a single chain antibody fragment (scFv). *Bioprocess Biosyst Eng* **35**: 1603–1614.
- Ferrer, P., Montesinos, J.L., Valero, F., and Solà, C. (2001) Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa*. *Appl Biochem Biotechnol - Part A Enzym Eng Biotechnol* **95**: 221–255.

- Fidan, O. and Zhan, J. (2015) Recent advances in engineering yeast for pharmaceutical protein production. *RSC Adv* **5**: 86665–86674.
- Filho, D.G., Silva, A.G., and Guidini, C.Z. (2019) Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**: 7399–7423.
- Fischer, J.E., Hatzl, A.-M., Weninger, A., Schmid, C., and Glieder, A. (2019) Methanol independent expression by *Pichia pastoris* employing de-repression technologies. *J Vis Exp* **143**: e58589.
- Ganjalkhany, M.R., Ranjbar, B., Taghavi, A.H., and Tohidi Moghadam, T. (2012) Functional motions of *Candida antarctica* lipase B: A survey through open-close conformations. *PLoS One* **7**: e40327.
- Garcia-Ortega, X., Adelantado, N., Ferrer, P., Montesinos, J.L., and Valero, F. (2016) A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*: From specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. *Process Biochem* **51**: 681–691.
- García-Ortega, X., Cámara, E., Ferrer, P., Albiol, J., Montesinos-Seguí, J.L., and Valero, F. (2019) Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol free *GAP* promoter. Where do we stand? *N Biotechnol* **53**: 24–34.
- Garcia-Ortega, X., Ferrer, P., Montesinos, J.L., and Valero, F. (2013) Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive *GAP* promoter. *Biochem Eng J* **79**: 172–181.
- Gasser, B. and Mattanovich, D. (2018) A yeast for all seasons – Is *Pichia pastoris* a suitable chassis organism for future bioproduction? *FEMS Microbiol Lett* **365**: 181.
- Gasser, B., Steiger, M.G., and Mattanovich, D. (2015) Methanol regulated yeast promoters: production vehicles and toolbox for synthetic biology. *Microb Cell Fact* **14**: 196.
- Geoffry, K. and Achur, R.N. (2018) Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatal Agric Biotechnol* **14**: 241–253.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., *et al.* (1996) Life with 6000 Genes. *Science* (80-) **274**: 546 LP – 567.
- Graf, A., Dragosits, M., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2009) Yeast systems biotechnology for the production of heterologous proteins. *FEMS Yeast Res* **9**: 335–348.
- Gramelsberger, G. (2018) Continuous culture techniques as simulators for standard cells: Jacques Monod's, Aron Novick's and Leo Szilard's quantitative approach to microbiology. *Hist Philos Life Sci* **40**: 23.
- Gresham, D. and Dunham, M.J. (2014) The enduring utility of continuous culturing in experimental evolution. *Genomics* **104**: 399–405.
- Gupta, R., Kumari, A., Syal, P., and Singh, Y. (2015) Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Prog Lipid Res* **57**: 40–54.
- Han, Y., Zhou, X., and Zheng, L. (2019) Rational enhancement of enzyme-catalyzed

- enantioselective reaction by construction of recombinant enzymes based on additive strategy. *Bioprocess Biosyst Eng*.
- Hao, Y., Zheng, X., Zhang, X., Zhang, K., Lin, Y., and Liang, S. (2019) Combined strategies for engineering a novel whole-cell biocatalyst of *Candida rugosa* lipase with improved characteristics. *Biochem Eng J* **151**: 107337.
- Hartner, F.S. and Glieder, A. (2006) Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact* **5**: 39.
- Hartner, F.S., Ruth, C., Langenegger, D., Johnson, S.N., Hyka, P., Lin-Cereghino, G.P., *et al.* (2008) Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res* **36**: 76.
- Hesketh, A.R., Castrillo, J.I., Sawyer, T., Archer, D.B., and Oliver, S.G. (2013) Investigating the physiological response of *Pichia (Komagataella) pastoris* GS115 to the heterologous expression of misfolded proteins using chemostat cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 9747–9762.
- Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N., and Mattanovich, D. (2004) Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* **85**: 367–375.
- Hoskisson, P.A. and Hobbs, G. (2005) Continuous culture - Making a comeback? *Microbiology* **151**: 3153–3159.
- Houdebine, L.-M. (2009) Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **32**: 40.
- Huang, M., Bao, J., Hallström, B.M., Petranovic, D., and Nielsen, J. (2017) Efficient protein production by yeast requires global tuning of metabolism. *Nat Commun* **8**: 1131
- Huang, M., Bao, J., and Nielsen, J. (2014) Biopharmaceutical protein production by *Saccharomyces cerevisiae*: current state and future prospects. *Pharm Bioprocess* **2**: 167–182.
- Hwang, H.T., Qi, F., Yuan, C., Zhao, X., Ramkrishna, D., Liu, D., and Varma, A. (2014) Lipase-catalyzed process for biodiesel production: protein engineering and lipase production. *Biotechnol Bioeng* **111**: 639–653.
- Illanes, A. (2008) Introduction. In, *Enzyme Biocatalysis*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 1–56.
- Inan, M., Aryasomayajula, D., Sinha, J., and Meagher, M.M. (2006) Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol Bioeng* **93**: 771–778.
- Jahic, M., Veide, A., Charoenrat, T., Teeri, T., and Enfors, S.O. (2006) Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog* **22**: 1465–1473.
- Jungo, C., Rérat, C., Marison, I.W., and von Stockar, U. (2006) Quantitative characterization of the regulation of the synthesis of alcohol oxidase and of the expression of recombinant avidin in a *Pichia pastoris* Mut+ strain. *Enzyme Microb Technol* **39**: 936–944.

- Juturu, V. and Wu, J.C. (2018) Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: Latest research progress and applications. *ChemBioChem* **19**: 7–21.
- Kang, Z., Huang, H., Zhang, Y., Du, G., and Chen, J. (2017) Recent advances of molecular toolbox construction expand *Pichia pastoris* in synthetic biology applications. *World J Microbiol Biotechnol* **33**: 19.
- Ken Ugo, A., Vivian Amara, A., CN, I., and Kenechuwku, U. (2017) Microbial lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products: a review. *Ferment Technol* **06**:
- Kim, H., Yoo, S.J., and Kang, H.A. (2015) Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Res* **15**: 1–16.
- Kim, J., Salvador, M., Saunders, E., González, J., Avignone-Rossa, C., and Jiménez, J.I. (2016) Properties of alternative microbial hosts used in synthetic biology: towards the design of a modular chassis. *Essays Biochem* **60**: 303–313.
- Kim, S.J., Lee, J.A., Kim, Y.H., and Song, B.K. (2009) Optimization of the functional expression of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by varying the host and promoter. *J Microbiol Biotechnol* **19**: 966–971.
- Kirk, O. and Christensen, M.W. (2002) Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Org Process Res Dev* **6**: 446–451.
- Kourist, R., Domínguez De María, P., and Miyamoto, K. (2011) Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of profens - Recent trends and developments. *Green Chem* **13**: 2607–2618.
- Krainer, F.W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O., and Glieder, A. (2012) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microb Cell Fact* **11**: 22.
- Küberl, A., Schneider, J., Thallinger, G.G., Anderl, I., Wibberg, D., Hajek, T., *et al.* (2011) High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435. *J Biotechnol* **154**: 312–320.
- Kundys, A., Bialecka-Florjańczyk, E., Fabiszewska, A., and Małajowicz, J. (2018) *Candida antarctica* Lipase B as Catalyst for Cyclic Esters Synthesis, Their Polymerization and Degradation of Aliphatic Polyesters. *J Polym Environ* **26**: 396–407.
- Kuo, T.C., Shaw, J.F., and Lee, G.C. (2015) Improvement in the secretory expression of recombinant *Candida rugosa* lipase in *Pichia pastoris*. *Process Biochem* **50**: 2137–2143.
- Landes, N., Gasser, B., Vorauer-Uhl, K., Lhota, G., Mattanovich, D., and Maurer, M. (2016) The vitamin-sensitive promoter *PTHIII* enables pre-defined autonomous induction of recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* **113**: 2633–2643.
- Laukens, B., De Wachter, C., and Callewaert, N. (2015) Engineering the *Pichia pastoris* N-glycosylation pathway using the glycoswitch technology. *Methods Mol Biol* **1321**: 103–122.
- Li, C., Lin, Y., Zheng, X., Yuan, Q., Pang, N., Liao, X., *et al.* (2017) Recycling of a

- selectable marker with a self-excisable plasmid in *Pichia pastoris*. *Sci Rep* **7**: 11113.
- Li, D., Zhang, B., Li, S., Zhou, J., Cao, H., Huang, Y., and Cui, Z. (2017) A Novel Vector for Construction of Markerless Multicopy Overexpression Transformants in *Pichia pastoris*. *Front Microbiol* **8**: 1698.
- Li, X., Liu, Z., Wang, G., Pan, D., Jiao, L., and Yan, Y. (2016) Overexpression of *Candida rugosa* lipase Lip1 via combined strategies in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* **82**: 115–124.
- Lian, J., Mishra, S., and Zhao, H. (2018) Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: New tools and their applications. *Metab Eng* **50**: 85–108.
- Lima, R.N., dos Anjos, C.S., Orozco, E.V.M., and Porto, A.L.M. (2019) Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. *Mol Catal* 75–105.
- Liu, S. (2017) Cell Cultivation. In, *Bioprocess Engineering*. Elsevier, pp. 699–782.
- Liu, W.-C., Inwood, S., Gong, T., Sharma, A., Yu, L.-Y., and Zhu, P. (2019) Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. *Crit Rev Biotechnol* **39**: 258–271.
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., *et al.* (2015) Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv* **33**: 1177–1193.
- Looser, V., Lüthy, D., Straumann, M., Hecht, K., Melzoch, K., and Kovar, K. (2017) Effects of glycerol supply and specific growth rate on methanol-free production of CALB by *P. pastoris*: functional characterisation of a novel promoter. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**: 3163–3176.
- López, N., Pernas, M.A., Pastrana, L.M., Sánchez, A., Valero, F., and Rúa, M.L. (2004) Reactivity of Pure *Candida rugosa* Lipase Isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in Aqueous and Organic Media. Influence of the Isoenzymatic Profile on the Lipase Performance in Organic Media. *Biotechnol Prog* **20**: 65–73.
- Lotti, M., Grandori, R., Fusetti, F., Longhi, S., Brocca, S., Tramontane, A., and Alberghina, L. (1993) Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. *Gene* **124**: 45–55.
- Love, K.R., Dalvie, N.C., and Love, J.C. (2018) The yeast stands alone: the future of protein biologic production. *Curr Opin Biotechnol* **53**: 50–58.
- Maccani, A., Landes, N., Stadlmayr, G., Maresch, D., Leitner, C., Maurer, M., *et al.* (2014) *Pichia pastoris* secretes recombinant proteins less efficiently than Chinese hamster ovary cells but allows higher space-time yields for less complex proteins. *Biotechnol J* **9**: 526–537.
- de Macedo Robert, J., Garcia-Ortega, X., Montesinos-Seguí, J.L., Guimaraes Freire, D.M., and Valero, F. (2019) Continuous operation, a realistic alternative to fed-batch fermentation for the production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* under the constitutive promoter *PGK* in *Pichia pastoris*. *Biochem Eng J* **147**: 39–47.
- Marsalek, L., Puxbaum, V., Buchetics, M., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2019) Disruption of vacuolar protein sorting components of the HOPS complex leads to

- enhanced secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **18**: 119.
- Massahi, A. and Çalık, P. (2016) Endogenous signal peptides in recombinant protein production by *Pichia pastoris*: From in-silico analysis to fermentation. *J Theor Biol* **408**: 22–33.
- Massahi, A. and Çalık, P. (2018) Naturally occurring novel promoters around pyruvate branch-point for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*): Pyruvate decarboxylase- and pyruvate kinase- promoters. *Biochem Eng J* **138**: 111–120.
- Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J., Dragosits, M., Redl, A., Maurer, M., *et al.* (2009) Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **8**: 29.
- McGeachy, A.M., Meacham, Z.A., and Ingolia, N.T. (2019) An accessible continuous-culture turbidostat for pooled analysis of complex libraries. *ACS Synth Biol* **8**: 844–856.
- Mears, L., Stocks, S.M., Albaek, M.O., Sin, G., and Gernaey, K. V. (2017) Mechanistic fermentation models for process design, monitoring, and control. *Trends Biotechnol* **35**: 914–924.
- Mears, L., Stocks, S.M., Sin, G., and Gernaey, K. V. (2017) A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes. *J Biotechnol* **245**: 34–46.
- Moreira de Almeida, J.R., Pepe de Moraes, L.M., and Gonçalves Torres, F.A. (2005) Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*PGK1*) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast* **22**: 725–737.
- Müller, J.M., Bruhn, S., Flaschel, E., Friehs, K., and Risse, J.M. (2016) *GAP* promoter-based fed-batch production of highly bioactive core streptavidin by *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog* **32**: 855–864.
- Nieto-Taype, M.A., Garcia-Ortega, X., Albiol, J., Montesinos-Seguí, J.L., Valero, F. (2019) Continuous cultivation as a tool towards the rational bioprocess development with *Pichia pastoris* cell factory. *Front. Bioeng. Biotechnol.* Under revision.
- Nordén, K., Agemark, M., Danielson, J.Å.H., Alexandersson, E., Kjellbom, P., and Johanson, U. (2011) Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol* **11**: 47.
- Ortiz, C., Ferreira, M.L., Barbosa, O., Dos Santos, J.C.S., Rodrigues, R.C., Berenguer-Murcia, Á., *et al.* (2019) Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? *Catal Sci Technol* **9**: 2380–2420.
- Overton, T.W. (2014) Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov Today* **19**: 590–601.
- Peebo, K. and Neubauer, P. (2018) Application of continuous culture methods to recombinant protein production in microorganisms. *Microorganisms* **6**: 56.
- Pekarsky, A., Veiter, L., Rajamanickam, V., Herwig, C., Grünwald-Gruber, C., Altmann, F., and Spadiut, O. (2018) Production of a recombinant peroxidase in different glyco-

- engineered *Pichia pastoris* strains: a morphological and physiological comparison. *Microb Cell Fact* **17**: 183.
- Peña, D.A., Gasser, B., Zanghellini, J., Steiger, M.G., and Mattanovich, D. (2018) Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metab Eng* **50**: 2–15.
- Periyasamy, S., Govindappa, N., Sreenivas, S., and Sastry, K. (2013) Isolation, characterization and evaluation of the *Pichia pastoris* sorbitol dehydrogenase promoter for expression of heterologous proteins. *Protein Expr Purif* **92**: 128–133.
- Piamtongkam, R., Duquesne, S., Bordes, F., Barbe, S., André, I., Marty, A., and Chulalaksananukul, W. (2011) Enantioselectivity of *Candida rugosa* lipases (Lip1, Lip3, and Lip4) towards 2-bromo phenylacetic acid octyl esters controlled by a single amino acid. *Biotechnol Bioeng* **108**: 1749–1756.
- Ponte, X., Barrigón, J.M., Maurer, M., Mattanovich, D., Valero, F., and Montesinos-Seguí, J.L. (2018) Towards optimal substrate feeding for heterologous protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella* spp) fed-batch processes under P_{AOX1} control: a modeling aided approach. *J Chem Technol Biotechnol* **93**: 3208–3218.
- Ponte, X., Montesinos-Seguí, J.L., and Valero, F. (2016) Bioprocess efficiency in *Rhizopus oryzae* lipase production by *Pichia pastoris* under the control of P_{AOX1} is oxygen tension dependent. *Process Biochem* 1–10.
- Porro, D., Gasser, B., Fossati, T., Maurer, M., Branduardi, P., Sauer, M., and Mattanovich, D. (2011) Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**: 939–948.
- Portela, R.M.C., Vogl, T., Ebner, K., Oliveira, R., and Glieder, A. (2018) *Pichia pastoris* alcohol oxidase 1 (*AOX1*) core promoter engineering by high resolution systematic mutagenesis. *Biotechnol J* **13**: 1700340.
- Portela, R.M.C., Vogl, T., Kniely, C., Fischer, J.E., Oliveira, R., and Glieder, A. (2017) Synthetic core promoters as universal parts for fine-tuning expression in different yeast species. *ACS Synth Biol* **6**: 471–484.
- Potgieter, T.I., Cukan, M., Drummond, J.E., Houston-Cummings, N.R., Jiang, Y., Li, F., et al. (2009) Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* **139**: 318–325.
- Potvin, G., Ahmad, A., and Zhang, Z. (2012) Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J* **64**: 91–105.
- Prielhofer, R., Barrero, J.J., Steuer, S., Gassler, T., Zahrl, R., Baumann, K., et al. (2017) GoldenPiCS: A Golden Gate-derived modular cloning system for applied synthetic biology in the yeast *Pichia pastoris*. *BMC Syst Biol* **11**: 123.
- Prielhofer, R., Cartwright, S.P., Graf, A.B., Valli, M., Bill, R.M., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2015) *Pichia pastoris* regulates its gene-specific response to different carbon sources at the transcriptional, rather than the translational, level. *BMC Genomics* **16**: 167.
- Prielhofer, R., Maurer, M., Klein, J., Wenger, J., Kiziak, C., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2013) Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **12**: 5.

- Prielhofer, R., Reichinger, M., Wagner, N., Claes, K., Kiziak, C., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2018) Superior protein titers in half the fermentation time: Promoter and process engineering for the glucose-regulated *GTH1* promoter of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng.*
- Puxbaum, V., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2015) Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 2925–2938.
- Qin, X., Qian, J., Yao, G., Zhuang, Y., Zhang, S., and Chu, J. (2011) GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 3600–3608.
- Rantasalo, A., Vitikainen, M., Paasikallio, T., Jäntti, J., Landowski, C.P., and Mojzita, D. (2019) Novel genetic tools that enable highly pure protein production in *Trichoderma reesei*. *Sci Rep* **9**: 5032.
- Raschmanová, H., Weninger, A., Glieder, A., Kovar, K., and Vogl, T. (2018) Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects. *Biotechnol Adv* **36**: 641–665.
- Raschmanová, H., Zamora, I., Borčinová, M., Meier, P., Weninger, A., Mächler, D., *et al.* (2019) Single-cell approach to monitor the unfolded protein response during biotechnological processes with *Pichia pastoris*. *Front Microbiol* **10**: 335.
- Rebello, S., Abraham, A., Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Karthika Bahuleyan, A., *et al.* (2018) Non-conventional yeast cell factories for sustainable bioprocesses. *FEMS Microbiol Lett* **365**: 222.
- Robinson, P.K. (2015) Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem* **59**: 1–41.
- Roth, G., Letícia Vanz, A., Lünsdorf, H., Nimtz, M., and Rinas, U. (2018) Fate of the UPR marker protein Kar2/Bip and autophagic processes in fed-batch cultures of secretory insulin precursor producing *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **17**: 123.
- Sanchez-Garcia, L., Martín, L., Manges, R., Ferrer-Miralles, N., Vázquez, E., and Villaverde, A. (2016) Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update. *Microb Cell Fact* **15**: 33.
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., and Sumana, C. (2018) Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnol Prog* **34**: 5–28.
- Schwarzahans, J.P., Luttermann, T., Geier, M., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2017) Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Adv* **35**: 681–710.
- Schwarzahans, J.-P., Wibberg, D., Winkler, A., Luttermann, T., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2016a) Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microb Cell Fact* **15**: 84.
- Schwarzahans, J.P., Wibberg, D., Winkler, A., Luttermann, T., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2016b) Non-canonical integration events in *Pichia pastoris* encountered during standard transformation analysed with genome sequencing. *Sci Rep* **6**: 1–12.

- SIB Swiss Institute of Bioinformatics (2012) ExPASy - ENZYME.
- Sindhu, R., Pandey, A., and Binod, P. (2016) Design and Types of Bioprocesses. In, *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls*. Elsevier, pp. 29–43.
- Singh, A.K. and Mukhopadhyay, M. (2012) Overview of fungal lipase: A review. *Appl Biochem Biotechnol* **166**: 486–520.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., and Mehta, P.K. (2017) Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech* **7**: 15.
- Sturmberger, L., Chappell, T., Geier, M., Krainer, F., Day, K.J., Vide, U., *et al.* (2016) Refined *Pichia pastoris* reference genome sequence. *J Biotechnol* **235**: 121–131.
- Su, F., Peng, C., Li, G.L., Xu, L., and Yan, Y.J. (2016) Biodiesel production from woody oil catalyzed by *Candida rugosa* lipase in ionic liquid. *Renew Energy* **90**: 329–335.
- Theron, C.W., Berrios, J., Delvigne, F., and Fickers, P. (2018) Integrating metabolic modeling and population heterogeneity analysis into optimizing recombinant protein production by *Komagataella (Pichia) pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**: 63–80.
- Theron, C.W., Berrios, J., Steels, S., Telek, S., Lecler, R., Rodriguez, C., and Fickers, P. (2019) Expression of recombinant enhanced green fluorescent protein provides insight into foreign gene-expression differences between Mut⁺ and MutS strains of *Pichia pastoris*. *Yeast* **36**: 285–296.
- Trbojević Ivić, J., Milosavić, N., Dimitrijević, A., Gavrović Jankulović, M., Bezbradica, D., Kolarski, D., and Veličković, D. (2017) Synthesis of medium-chain length capsinoids from coconut oil catalyzed by *Candida rugosa* lipases. *Food Chem* **218**: 505–508.
- Valero, F. (2013) Bioprocess engineering of *Pichia pastoris*, an exciting host eukaryotic cell expression system. In, *Protein Engineering - Technology and Application*, pp. 3–32.
- Vanleeuw, E., Winderickx, S., Thevissen, K., Lagrain, B., Dusselier, M., Cammue, B.P.A., and Sels, B.F. (2019) Substrate-specificity of *Candida rugosa* lipase and its industrial application. *ACS Sustain Chem Eng* **7**: 15828–15844.
- Vanz, A.L., Nimtz, M., and Rinas, U. (2014) Decrease of UPR- and ERAD-related proteins in *Pichia pastoris* during methanol-induced secretory insulin precursor production in controlled fed-batch cultures. *Microb Cell Fact* **13**: 1–10.
- Vieira Gomes, A., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F., Parachin, N. (2018) Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms* **6**: 38.
- Vogl, T., Gebbie, L., Palfreyman, R.W., and Speight, R. (2018) Effect of Plasmid Design and Type of Integration Event on Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol* **84**: e02712-17.
- Vogl, T. and Glieder, A. (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *N Biotechnol* **30**: 385–404.
- Vogl, T., Kickenweiz, T., Pitzer, J., Sturmberger, L., Weninger, A., Biggs, B.W., *et al.*

- (2018) Engineered bidirectional promoters enable rapid multi-gene co-expression optimization. *Nat Commun* **9**: 3589.
- Vogl, T., Ruth, C., Pitzer, J., Kickenweiz, T., and Glieder, A. (2014) Synthetic core promoters for *Pichia pastoris*. *ACS Synth Biol* **3**: 188–191.
- Vogl, T., Sturmberger, L., Fauland, P.C., Hyden, P., Fischer, J.E., Schmid, C., *et al.* (2018) Methanol independent induction in *Pichia pastoris* by simple derepressed overexpression of single transcription factors. *Biotechnol Bioeng* **115**: 1037–1050.
- Vogl, T., Sturmberger, L., Kickenweiz, T., Wasmayer, R., Schmid, C., Hatzl, A.M., *et al.* (2016) A toolbox of diverse promoters related to methanol utilization: functionally verified parts for heterologous pathway expression in *Pichia pastoris*. *ACS Synth Biol* **5**: 172–186.
- Wagner, J.M. and Alper, H.S. (2016) Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genet Biol* **89**: 126–136.
- Waterham, H.R., Digan, M.E., Koutz, P.J., Lair, S. V., and Cregg, J.M. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* **186**: 37–44.
- Weinhandl, K., Winkler, M., Glieder, A., and Camattari, A. (2014) Carbon source dependent promoters in yeasts. *Microb Cell Fact* **13**: 5.
- Weninger, A., Fischer, J.E., Raschmanová, H., Kniely, C., Vogl, T., and Glieder, A. (2018) Expanding the CRISPR/Cas9 toolkit for *Pichia pastoris* with efficient donor integration and alternative resistance markers. *J Cell Biochem* **119**: 3183–3198.
- Wurm, D.J. and Spadiut, O. (2019) Efficient development of a mixed feed process for *Pichia pastoris*. In, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY, pp. 323–333.
- Xu, L., Jiang, X., Yang, J., Liu, Y., and Yan, Y. (2010) Cloning of a novel lipase gene, lipJ08, from *Candida rugosa* and expression in *Pichia pastoris* by codon optimization. *Biotechnol Lett* **32**: 269–276.
- Yang, Z. and Zhang, Z. (2018) Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv* **36**: 182–195.
- Yu, P., Zhu, Q., Chen, K., and Lv, X. (2015) Improving the secretory production of the heterologous protein in *Pichia pastoris* by focusing on protein folding. *Appl Biochem Biotechnol* **175**: 535–548.
- Yu, X.W., Sun, W.H., Wang, Y.Z., and Xu, Y. (2017) Identification of novel factors enhancing recombinant protein production in multi-copy *Komagataella phaffii* based on transcriptomic analysis of overexpression effects. *Sci Rep* **7**..
- Zahrl, R.J., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2018) The impact of ERAD on recombinant protein secretion in *Pichia pastoris* (syn *Komagataella* spp.). *Microbiol (United Kingdom)* **164**: 453–463.
- Zahrl, R.J., Peña, D.A., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2017) Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res* **17**..
- Zhao, W., Wang, J., Deng, R., and Wang, X. (2008) Scale-up fermentation of recombinant

Candida rugosa lipase expressed in *Pichia pastoris* using the *GAP* promoter. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**: 189–195.

Zisis, T., Freddolino, P.L., Turunen, P., Van Teeseling, M.C.F., Rowan, A.E., and Blank, K.G. (2015) Interfacial activation of *Candida antarctica* lipase B: Combined evidence from experiment and simulation. *Biochemistry* **54**: 5969–5979.

2 Objectives

The main objective of the current thesis is focused on the enhancement of the efficiency of *P. pastoris* as recombinant protein production (RPP) platform by using different strategies based on bioprocess and strain engineering, specifically, on the production of two lipases with industrial interest, *Candida rugosa* lipase 1 (Cr11) and *Candida antarctica lipase B* (CalB), with clones regulated under the constitutive *GAP* promoter. In this sense, each chapter was focused on one specific strategy which is detailed in the specific objectives below:

- ❖ Evaluate the key role of production kinetics during the development of rational based operating strategies which can be used to optimize the production of Cr11 on fed-batch cultures through its previous characterization in chemostat cultures, including transcriptional analysis of some target genes.
- ❖ Determine and characterize in chemostat cultures the potential benefits of carbon-starving on RPP (Cr11 production) as a novel strategy to be implemented on fed batch cultures.
- ❖ Study the differential effects of using P_{GAP} and the classical inducible P_{AOXI} , two of the most extended promoters in *P. pastoris*, to perform the comparison of bioprocess parameters and production kinetics by using chemostat cultures at different dilution rates (D) producing Cr11.
- ❖ Characterize the performance of two methanol-free novel promoters as an emerging alternative to the classical promoters to exploit the capabilities of *P. pastoris* as cell factory, in order to maximize the productivity and yields in CalB production processes. Finally, comparison with *GAP* promoter.

3 Materiales y métodos

3.1 Construcción de plásmidos y generación de cepas

3.1.1 Clones expresando el gen de la lipasa 1 de *Candida rugosa* (*CRL1*)

Se construyeron diferentes cepas recombinantes de *P. pastoris* expresando el gen optimizado (*codon-optimized*) de la lipasa 1 de *Candida rugosa* (*CRL1*) bajo la regulación del promotor *GAP* (P_{GAP}) y *AOX1* (P_{AOX1}). Los vectores quiméricos se ensamblaron mediante haciendo uso del método de restricción-ligación haciendo uso de los plásmidos comerciales PGAPZ α A y el PPICZ α A de Invitrogen (Carlsbad, CA, US), respectivamente para cada promotor con gen sintético el cual cuenta con la secuencia codón-optimizada (*codon-optimized*) de *CRL1* de GeneScript (Piscataway, NJ, USA). Después, la cepa salvaje (*wild-type*) de *P. pastoris* X-33 fue transformada siguiendo las condiciones descritas por Cámara *et al.* (2019). Se utilizaron diferentes concentraciones de plásmido en la electroporación con el fin de obtener clones con una copia (*single copy clone*, SCC) y varias copias (*multi-copy clone*, MCC) integradas del *cassette* de expresión en el genoma del hospedero.

3.1.2 Clones expresando el gen de la lipasa B de *Candida antártica* (*CALB*)

Del mismo modo se construyeron cepas recombinantes de *P. pastoris*, que en este caso expresaban el gen de la lipasa B de *Candida antarctica*. Se obtuvieron cuatro vectores quiméricos que hacen uso de los promotores GAP (P_{GAP}), G1 (P_{G1}) y G2 (P_{G2}), los cuales regulan la expresión del gen sintético que contiene la secuencia -optimizada (*codon-optimized*) de *CALB* de GeneScript (Piscataway, NJ, USA). Los vectores ensamblados fueron proporcionados por el Prof. Anton Glieder de la Graz University of Technology (Graz, Austria) y CEO de la empresa Bisys GmbH (Biology for synthesis, Austria).

Para la expresión de CalB se transformaron los vectores descritos en la cepa BG11 de BioGrammatics, Inc (Carlsbad, CA; USA), siguiendo las condiciones descritas por Lin-Cereghino *et al.* (2005). Para este caso el objetivo fue obtener sólo clones que contaran con una copia del gen de interés integrada en el genoma.

3.2 *Screening* de los transformantes productores de Crl1

Para realizar el *screening* de los clones positivos obtenidos durante la generación de las cepas productoras de Crl1, se siguió el protocolo descrito en el manual *Pichia Expression Kit* de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) modificado.

Se inició con un precultivo de 10 mL de YPG (2 % de peptona, 1 % de extracto de levadura, 2 % glicerol; pH=7) al cual se añadió zeocina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se incubó durante 24 h a 25°C y 150 rpm de agitación. Después, se continuó con los cultivos en matraces (*shake-flask*) de 250 mL, los cuales contenían 40 mL de medio BMG 1 % (tampón fosfato 0.1 M pH 6.0, 1.34 % YNB, $4 \cdot 10^{-5}$ % de biotina y 1 % de glicerol). A partir de los precultivos se procedió a la inoculación en matraces para obtener una OD_{600} inicial de 0.1. Se incubó durante aproximadamente 16 h bajo las mismas condiciones de cultivo.

Una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial, dependiendo del promotor utilizado, se procedió a la fase de inducción. Por un lado, los clones regulados bajo el control del P_{GAP} se inocularon en 40 mL de BMD 1 % (tampón fosfato 0.1 M pH 6.0, 1.34 % YNB, $4 \cdot 10^{-5}$ % de biotina y 1 % glucosa) a OD_{600} inicial de 0.1; mientras que aquellos gobernados por el P_{AOX1} fueron inoculados en 40 mL BMM 0.5 % (tampón fosfato 0.1 M pH 6.0, 1.34 % YNB, $4 \cdot 10^{-5}$ % de biotina y 0.5 % de metanol) a una OD_{600} inicial de 1.0. Se mantuvieron estos cultivos por alrededor de 48 h con una humedad del 80%.

3.3 *Screening* de los transformantes productores de CalB

Para realizar el primer y segundo *screening* de las cepas transformantes de *P. pastoris* se realizaron cultivos en placas de cultivo de 96 pocillos (*deep well plate*, DWP) de acuerdo con el protocolo descrito con anterioridad (Weis *et al.*, 2004; Krainer *et al.*, 2016). Las células fueron cultivadas a partir de colonias previamente aisladas en 250 μL de BMD 1 % (tampón fosfato 0.2 M pH 7.0, 1.34 % YNB, $4 \cdot 10^{-5}$ % de biotina y 1% de D (+) glucosa monohidratada) durante aproximadamente 60 h, seguido de la adición de 250 μL de BMD 1 % y después de 50 μL de BMG 5 % (tampón fosfato 0.2 M pH 7.0, 1.34 % YNB, $4 \cdot 10^{-5}$ % de biotina y 1 % de D (+) glucosa monohidratada y 5% de glicerol) cada 12 h hasta llegar a las 48 h de alimentación. Finalmente, se tomó una muestra para

medir la biomasa (OD_{600}) y se centrifugó cada DWP a 4500 rpm durante 15 min para los análisis llevados a cabo con el sobrenadante.

3.4 Determinación del número de copias

Se utilizó la técnica de *droplet digital* PCR (ddPCR) para determinar el número de integraciones de *cassette* en los clones que expresan *CRL1*. La versión utilizada fue ligeramente modificada respecto del método de referencia descrito por Cámara *et al.* (2016) haciendo uso del kit QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix de Biorad (Hercules, CA, USA). El gen de actina se utilizó como referencia (*housekeeping*), sin embargo, la secuencia del *primer* utilizado fue la propuesta por Landes *et al.* (2016). Los *primers* específicos para *CRL1* se muestran en la tabla 3.1.

Por otro lado, en los laboratorios de la Universidad TU Graz, se utilizó la técnica de *quantitative* PCR (qPCR) para determinar el número de copias integradas de los clones que expresan *CALB*. Se hizo uso del kit Power SYBR® Green PCR Master Mix de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, US). El gen *ARG4* se utilizó como *housekeeping* tal como lo describe Abad *et al.* (2010) y se determinó el número de copias en función gen de resistencia a zeocina (*ZEO*) propio del vector quimérico. Los *primers* específicos utilizados en este ensayo se muestran también en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Pares de *primers* utilizados para la determinación de la dosis génica (*gene dosage*) a través ddPCR y qPCR, respectivamente.

#	Nombre	Producto	Función en el análisis	Secuencia
1	ACT_FW	ACT	<i>ddPCR gene dosage housekeeping (CRL1)</i>	CCTGAGGCTTTGTTCCACCCATCT
2	ACT_RE			GGAACATAGTAGTACCACCGGACATAACGA
3	ARG4_FW	ARG4	<i>qPCR gene dosage housekeeping (CaB)</i>	TCCTCCGGTGGCAGTTCTT
4	ARG4_RE			TCCATTGACTCCCCTTTTGAG
5	CRL1_FW	CRL1	<i>ddPCR gene dosage for CRL1 clones</i>	CCTGAGGGTACTTACGAAG
6	CRL1_RE			CCAGGTGGTCTAACAACG
7	ZEO_FW	ZEO	<i>qPCR Gene dosage for CaB clones</i>	GACTCGGTTTCTCCCCTGACT
8	ZEO_RE			CTGCGGAGATGAACAGGGTAA

3.5 Análisis transcripcional de los clones que expresan *CRL1* en cultivos en quimiostato

Los análisis transcripcionales se realizaron a partir de las muestras obtenidas en cultivos de quimiostato, en donde las condiciones de estado estacionario aseguraron la homogeneidad en la población celular.

3.5.1 Extracción total de RNA

Se extrajeron muestras de 1 mL en diferentes condiciones de quimiostato, las cuales se centrifugaron a 4 °C a máxima velocidad durante 2 minutos. Los *pellets* resultantes se resuspendieron en 1 ml de TRIzol™ (Waltham, Massachusetts, USA) y 200 mg perlas de vidrio (*glass-beads*). La lisis celular fue realizada mediante ciclos alternantes de 30 s de agitación y congelación. El ARN total se extrajo según las instrucciones del fabricante. Luego, la integridad y concentración de ARN se verificaron mediante electroforesis en agarosa y análisis Nanodrop (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA), respectivamente.

3.5.2 Síntesis de cDNA y niveles transcripcionales

El cDNA fue sintetizado con el kit de síntesis cDNA iScript™ de Bio-Rad (Hércules, CA, US) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la qPCR, se diseñó un set de *primers* (Tabla 3.2) para cDNA diana. El set de genes estudiados comprendió *CRL1* (gen heterólogo); *TDH3*, el cual es el gen nativo que se expresa bajo el control del P_{GAP} (glicolítico); y el gen *PGK*, de la fosfoglicerato quinasa (glicolítico). También se estudiaron genes adicionales involucrados en la respuesta a proteínas mal plegadas (*unfolded protein response*, UPR) tales como *KAR2* y *HAC1*. Los niveles de transcripción se evaluaron por amplificación qPCR con el SYBR™ Select Master Mix (Thermo Scientific™ Waltham, MA, USA). Para obtener la máxima precisión, el robot EpMotion® (Eppendorf, Alemania) realizó mezclas de reacción. El programa de amplificación fue ejecutado en el equipo QuantStudio 12K Flex Real-Time de Thermo Scientific™ (Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La temperatura de *annealing*/extensión fue de 57.4 °C. El mismo equipo se encargó también de la adquisición y análisis de datos tanto en el programa de qPCR como en la curva de *melting*.

El nivel de transcripción relativa se determinó utilizando el gen del regulador *MTH1* como *housekeeping*. Rebnegger *et al.* (2014)) encontraron previamente que la velocidad específica de crecimiento no es influyente en su expresión.

Tabla 3.2. Pares de *primers* utilizados para la determinación de los niveles de transcripción relativa a través qPCR.

#	Nombre	Producto	Función en el análisis	Secuencia
1	MTH1_FW	MTH1	<i>qPCR transcription housekeeping</i>	GGAACCTGGTCAACTGGGAACT
2	MTH1_RE			GTGGGAGGAGAACGATGTGGAA
3	CRL1_FW	CRL1	<i>Transcription analysis</i>	CCTGAGGGTACTTACGAAG
4	CRL1_RE			CCAGGTGGTCTAACAACG
5	KAR2_FW	KAR2	<i>Transcription analysis</i>	GATGAAGTCGGGTCGTGTAC
6	KAR2_RE			TCTTAGCAGCATCACCCAACC
7	TDH3_FW	TDH3	<i>Transcription analysis</i>	GGTGAGGTTTCTGCCAGC
8	TDH3_RE			GTGGACTCAATGACGTAGTC
9	PGK1_FW	PGK1	Transcription analysis	AGAACGGTGGAACTGTCATCGT
10	PGK1_RE			AAAGAAGCTCCTCCTCCAGTGG
11	HAC1_FW	HAC1	Transcription analysis	CATTACAGCAGGCTCCATC
12	HAC1_RE			GTCAACTGATATGTGCCAAC

3.6 Análisis transcripcional a través de la secuenciación del transcriptoma (RNAseq) durante el estudio del efecto de la privación de carbono (*carbon-starving*) en cultivos en quimiostato

Para el análisis del transcriptoma en muestras obtenidas durante la caracterización del efecto del *carbon-starving* en la fisiología celular, las muestras de 1 mL se extrajeron y se centrifugaron a 4°C a máxima velocidad durante 2 minutos. Los *pellets* fueron conservados a -80°C y se enviaron a la empresa Biogramatics Inc (Carlsbad, CA, USA) para la secuenciación masiva del transcriptoma utilizando el sistema MiSeq System de Illumina (San Diego, CA, USA) quienes realizaron el ensamblaje de las secuencias, así

como el análisis de abundancia de los transcritos. Finalmente, la comparación entre las diferentes muestras se realizó utilizando código de programación (*script*) desarrollado con el programa RStudio en las instalaciones de la empresa Biology for Synthesis (Bisy GmbH, Graz, Austria).

3.7 Análisis transcripcional de cultivos en *shake flask* para los clones que expresan la lipasa B de *Candida antarctica* (*CalB*)

Los análisis transcripcionales se realizaron a partir de las muestras de 1 mL obtenidas a diferentes tiempos de los cultivos realizados en *shake flask* creciendo en condiciones limitantes de carbono gracias al uso de discos de liberación controlada de glicerol (cada disco libera el sustrato a una velocidad aproximada de 0.5 mg h⁻¹ según el fabricante). De este modo, se pudo tener una visión o comportamiento general de la expresión de *CALB*.

3.7.1 Extracción de RNA total

Se utilizó el kit SV Total RNA Isolation System de Promega (Madison, WI, USA). Se extrajeron muestras de 1ml, las cuales se centrifugaron a 4°C a máxima velocidad durante 2 minutos. Los *pellets* resultantes se resuspendieron en 100µl de sorbitol 1M y 175 µl de tampón de lisis y se añadieron 100 mg de *glass beads* con los cuales se procedió a realizar la lisis mecánica. Después se procedió acorde las instrucciones del fabricante. Luego, la integridad y concentración de ARN se verificaron mediante electroforesis en agarosa y análisis Nanodrop (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA), respectivamente.

3.7.2 Síntesis de cDNA y niveles transcripcionales

Para la síntesis de cDNA y análisis transcripcional se hizo uso del kit Luna® Universal One-Step RT_qPCR de New England Biolabs (Ipswich, MA, USA).

El nivel de transcripción relativa se determinó utilizando el gen del regulador *ACT1* como *housekeeping* para la evaluación de los niveles de transcripción de CalB (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Pares de *primers* utilizados para la determinación de los niveles de transcripción relativa de CalB a través qPCR.

#	Nombre	Producto	Función en el análisis	Secuencia
1	ACT1_FW	ACT1	<i>qPCR transcription housekeeping</i>	TATGCCGGTTTCTCCTTACCAC
2	ACT1_RE			GATGTCACGGACGATTCTCTCTC
3	CALB_FW	CALB	<i>Transcription analysis</i>	AGCCTTCTCACAGCCTAAATC
4	CALB_RE			CAGTACCTGGGACAAGCAAA

3.8 Cultivo en matraz (*shake flask*) para llevar a cabo el estudio sobre clones productores de CalB

Los cultivos en *shake flask*, se iniciaron con un preinóculo en matraces de 250 mL, a los cuales se añadió 50 mL de medio BMD 1 % y fueron inoculados con una colonia de cada clon estudiado. Se dejó incubar durante 18 h a 28 °C a 120 rpm, para después estimar la biomasa por absorbancia (OD₆₀₀).

Después, en base a las concentraciones de biomasa en cada matraz se procedió a inocular nuevos matraces de 250 mL con 50 mL de BMD 1 % a una OD₆₀₀ de 0.2 e incubar alrededor de 18 h. Finalmente, se añadieron 3 discos de alimentación (*feed-discs*) de glicerol de PS Biotech GmbH (Herzogenrath, Germany) y se monitorizó el cultivo por alrededor de 70 h. Cada disco libera el sustrato a una velocidad aproximada de 0.5 mg h⁻¹ según el fabricante.

3.9 Métodos de cultivo en biorreactor

Los inóculos para las pruebas de biorreactor se prepararon de acuerdo con Garcia-Ortega *et al.* (2013). Se realizaron cultivos durante 24 h en matraces de 1L a 25°C, 130 rpm en medio YPG (2% de peptona, 1% de extracto de levadura, 2% glicerol; pH=7) al cual se añadió zeocina (100 µg mL⁻¹).

3.9.1 Cultivo en quimiostato

Los cultivos se llevaron a cabo por duplicado en un biorreactor de 2 L Biostat B plus Bioreactor (Sartorius Stedim, Goettingen, Germany), tal como se describe previamente (Garcia-Ortega *et al.*, 2016). Se evaluaron diferentes velocidades específicas de crecimiento dependiendo el promotor utilizado en un volumen de trabajo de 1 L.

Los cultivos en quimiostato constaron de dos fases, una propiamente de *batch* que permitió obtener una alta concentración de biomasa, y de otra a continuación en la cual se procedió a introducir tanto los caudales de entrada para la adición del medio de quimiostato como conectar el sistema de salida. La composición del medio de *batch* y de quimiostato, se detallan a continuación por litro de medio:

-Medio de *batch*: 2.0 g de ácido cítrico, 12.4 g de (NH₄)₂HPO₄, 0.022 g de CaCl₂·2H₂O, 0.9 g de KCl, 0.5 g de MgSO₄·7H₂O, 40 g de glicerol, 2 mL de biotina (0.02%), 4.6 mL de PTM1 sales traza (6.0 g de CuSO₄·5H₂O, 0.08 g de NaI, 3.0 g de MnSO₄·H₂O, 0.2 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0.02 g de H₃BO₃, 0.5 g de CoCl₂, 20.0 g de ZnCl₂, 65.0 g de FeSO₄·7H₂O and 5.0 mL H₂SO₄ (95 %–98 %). La biotina y la solución PTM1 fueron esterilizadas separadamente por filtración (0.22 µm) y se añadieron al fermentador directamente después del proceso de esterilización en autoclave.

-Medio de quimiostato (*chemostat*): 0.92 g de ácido cítrico, 50 g de glicerol, 4.35 g de (NH₄)₂HPO₄, 0.65 g de MgSO₄·7H₂O, 1.7 g de KCl, 0.01 g de CaCl₂·2H₂O, 0.2 mL de antiespumante (*antifoam*) Glanapon 2000kz (Bussetti and Co GmbH Wien, Austria) y 1.6 mL de sales traza (PTM1), 1 mL de biotina. La biotina y la solución PTM1 fueron esterilizadas separadamente por filtración (0.22 µm).

Para cada velocidad de dilución (D), los cultivos continuos se llevaron a cabo durante al menos cinco tiempos de residencia. Con el fin de garantizar haber alcanzado el estado estacionario se tomaron y analizaron muestras cada tiempo de residencia a partir de los tres tiempos de residencia, hasta confirmar la estabilidad de los parámetros estudiados durante tres muestras consecutivas.

3.9.2 Cultivo en *fed-batch*

Los cultivos en fermentador en *fed-batch* se realizaron en un fermentador de 5 L Biostat B Bioreactor (Sartorius Stedim, Goettingen, Germany) a diferentes velocidades específicas de crecimiento (μ) que cubren un rango desde 0.025 hasta 0.15 h⁻¹. Todos los cultivos se llevaron a cabo bajo condiciones limitantes de carbono (glucosa), haciendo uso de un perfil de alimentación exponencial que permitió mantener una μ constante, alcanzando lo que se conoce como un estado pseudoestacionario. El proceso se describe en detalle por Garcia-Ortega *et al.* (2013).

3.10 Métodos analíticos

3.10.1 Determinación de biomasa como peso seco (*dry cell weight*, DCW)

La concentración de biomasa fue cuantificada por triplicado en términos de DCW como se describe en otra parte (Cos *et al.*, 2005). La desviación estándar relativa (*relative standard deviation*, RSD) fue de aproximadamente el 3 %.

3.10.2 Cuantificación de la fuente de carbono y subproductos.

Las concentraciones de las diferentes fuentes de carbono utilizadas en los cultivos en *batch* (glicerol), quimiostato (glucosa en el caso de la producción de Cr11 y glicerol para CalB) y *fed-batch* (glucosa), así como de los potenciales subproductos fueron determinados por HPLC. El equipo utilizado fue en un cromatógrafo *HP 1050 liquid chromatograph* (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) y la columna fue una *ICSep ICE COREGEL 87H3* (Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA). El procedimiento

utilizado fue de acuerdo al descrito previamente (García-Ortega *et al.*, 2017). El RSD siempre fue inferior al 1%.

3.10.3 Análisis de gases (*Off-gas analyses*)

Los analizadores de gas *BlueInOne Cell* (BlueSens, Herten, Germany) se utilizaron para determinar las composiciones de los gases de salida de los cultivos en quimiostato y *fed-batch*. Las fracciones molares de CO₂ y O₂ se midieron en línea (*on-line*), junto con la presión y humedad. Los datos así obtenidos se usaron para estimar la velocidad de consumo de oxígeno (*oxygen uptake rate*, OUR), la velocidad de producción del dióxido de carbono (CER), sus correspondientes velocidades específicas (q_{O2} y q_{CO2}) y el cociente respiratorio (RQ). El RSD fue inferior al 5% en todos los casos.

3.11 Ensayo de actividad lipolítica

3.11.1 Actividad lipolítica CrI1

Para determinar la actividad de CrI1 se hizo uso de un ensayo enzimático basado en *p*-nitrofenil-butirato (*p*NPB) con ligeras modificaciones (Chang *et al.*, 2006). El tampón de reacción consistió en *p*NPB 1 mM, tampón fosfato 50 mM a pH 7 y 4 % (v/v) de acetona. Se mezcló un volumen de 980 µL de tampón con 20 µL de muestra. La absorbancia a 348 nm se midió en línea a 30 °C durante 2 min en un espectrofotómetro *Specord 200 Plus* de Analytic Jena (Jena, Germany). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 mmol de *p*-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de ensayo previamente descritas. El RSD fue inferior al 1%.

3.11.2 Actividad lipolítica para CalB

Del mismo modo, para determinar la actividad de CalB se hizo uso de un ensayo enzimático basado en *p*-nitrofenil-butirato (*p*NPB) (Vogl *et al.*, 2018). El tampón de reacción consistió en *p*NPB 4 mM, tampón Tris-HCl 300 mM a pH 7.4 y 1 % (v/v) de acetona. Para el caso de los screening en DWP la actividad fue medida en *microtiter*

plates. Se mezcló un volumen de 180 μL de tampón con 20 μL de muestra, para luego medir la absorbancia a 405 nm durante 3 min a 30 °C en un lector de placas ClarioStar de BMG LABTECH (Offenburg, Germany). Por otra parte, para el análisis de las muestras obtenidas de cultivos en continuo, el ensayo enzimático se escaló a un volumen final de 1 mL para luego ser medido bajo las mismas condiciones en espectrofotómetro *Specord 200 Plus* de Analytic Jena (Jena, Germany). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de ensayo previamente descritas. El RSD fue en todos los casos inferior al 1%.

3.12 Parámetros de proceso

3.12.1 Balances de materia, estequiometría y parámetros cinéticos

Para la determinación de los parámetros clave de los cultivos en continuo y *fed-batch* fueron utilizadas las ecuaciones derivadas de los balances de materia. De esta manera, se pudieron obtener los rendimientos y velocidades específicas en los cultivos en quimiostato (García-Ortega *et al.*, 2016) y *fed-batch* (Ponte *et al.*, 2016). Los detalles de la determinación de los parámetros de interés fueron descritos con detalle previamente en las referencias citadas.

3.12.2 Consistencia y reconciliación de datos

La consistencia de las medidas experimentales se verificó utilizando los balances de carbono y electrón como restricciones. Tanto las mediciones en línea (*on-line*) como no en línea (*off-line*) permitieron calcular cinco velocidades específicas clave en el modelo de proceso tipo caja negra (*black box*) tales como: generación de biomasa (μ), consumo de glucosa (q_S), generación de producto (q_P), consumo de oxígeno (q_{O_2}) y producción de dióxido de carbono (q_{CO_2}). La velocidad específica de generación de producto (q_P) no se tuvo en cuenta en el procedimiento de comprobación de la consistencia de los datos experimentales y su posterior reconciliación por considerarse negligible en los balances. La metodología utilizada se describió en detalle previamente (Ponte *et al.*, 2016).

3.13 Referencias

- Abad, S., Kitz, K., Hörmann, A., Schreiner, U., Hartner, F.S., and Glieder, A. (2010) Real-time PCR-based determination of gene copy numbers in *Pichia pastoris*. *Biotechnol J* **5**: 413–420.
- Cámara, E., Albiol, J., and Ferrer, P. (2016) Droplet digital PCR-aided screening and characterization of *Pichia pastoris* multiple gene copy strains. *Biotechnol Bioeng* **113**: 1542–1551.
- Cámara, E., Monforte, S., Albiol, J., and Ferrer, P. (2019) Dereglulation of methanol metabolism reverts transcriptional limitations of recombinant *Pichia pastoris* (*Komagataella* spp) with multiple expression cassettes under control of the *AOX1* promoter. *Biotechnol Bioeng* **116**: 1710–1720.
- Chang, S.W., Lee, G.C., and Shaw, J.F. (2006) Codon optimization of *Candida rugosa* lip1 gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *J Agric Food Chem* **54**: 815–822.
- Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J.L., Ferrer, P., Cregg, J.M., and Valero, F. (2005) Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *J Biotechnol* **117**: 321–335.
- García-Ortega, X., Adelantado, N., Ferrer, P., Montesinos, J.L., and Valero, F. (2016) A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*: From specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. *Process Biochem* **51**: 681–691.
- García-Ortega, X., Ferrer, P., Montesinos, J.L., and Valero, F. (2013) Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive *GAP* promoter. *Biochem Eng J* **79**: 172–181.
- García-Ortega, X., Valero, F., and Montesinos-Seguí, J.L. (2017) Physiological state as transferable operating criterion to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris* through oxygen limitation. *J Chem Technol Biotechnol* **92**: 2573–2582.
- Krainer, F.W., Gerstmann, M.A., Darnhofer, B., Birner-Gruenberger, R., and Glieder, A. (2016) Biotechnological advances towards an enhanced peroxidase production in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* **233**: 181–189.
- Landes, N., Gasser, B., Vorauer-Uhl, K., Lhota, G., Mattanovich, D., and Maurer, M. (2016) The vitamin-sensitive promoter P_{THII1} enables pre-defined autonomous induction of recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* **113**: 2633–2643.
- Lin-Cereghino, J., Wong, W.W., Xiong, S., Giang, W., Luong, L.T., Vu, J., et al. (2005) Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques* **38**: 44–48.
- Ponte, X., Montesinos-Seguí, J.L., and Valero, F. (2016) Bioprocess efficiency in *Rhizopus oryzae* lipase production by *Pichia pastoris* under the control of P_{AOX1} is oxygen

tension dependent. *Process Biochem* 1–10.

Rebnegger, C., Graf, A.B., Valli, M., Steiger, M.G., Gasser, B., Maurer, M., and Mattanovich, D. (2014) In *Pichia pastoris*, growth rate regulates protein synthesis and secretion, mating and stress response. *Biotechnol J* **9**: 511–525.

Vogl, T., Kickenweiz, T., Pitzer, J., Sturmberger, L., Weninger, A., Biggs, B.W., et al. (2018) Engineered bidirectional promoters enable rapid multi-gene co-expression optimization. *Nat Commun* **9**: 3589.

Weis, R., Luiten, R., Skranc, W., Schwab, H., Wubbolts, M., and Glieder, A. (2004) Reliable high-throughput screening with *Pichia pastoris* by limiting yeast cell death phenomena. *FEMS Yeast Res* **5**: 179–189.

4 Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

This chapter has been published in *Microbial Biotechnology* Journal as research article:

Nieto-Taype, M.A., Garrigós-Martínez, J., Sánchez-Farrando, M., Valero, F., Garcia-Ortega, X., and Montesinos-Seguí, J.L. (2020) Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Microb Biotechnol* **13** (2): 315–327.

4.1 Summary

Its features as a microbial and eukaryotic organism have turned *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) into an emerging cell factory for recombinant protein production (RPP). As a key step of the bioprocess development, this work aims to demonstrate the importance of tailor designing the cultivation strategy according to the production kinetics of the cell factory. For this purpose, *K. phaffii* clones constitutively expressing (P_{GAP}) *Candida rugosa* lipase1 (Cr11) with different gene dosage were used as models in continuous and fed-batch cultures. Production parameters were much greater with a multi-copy clone (MCC) than with the single-copy clone (SCC). Regarding production kinetics, the specific product generation rate (q_P) increased linearly with increasing specific growth rate (μ) in SCC; by contrast, q_P exhibited saturation in MCC. A transcriptional analysis in chemostat cultures suggested the presence of eventual post-transcriptional bottlenecks in MCC. After the strain characterization, in order to fulfil overall development of the bioprocess, the performance of both clones was also evaluated in fed-batch mode. Strikingly, different optimal strategies were determined for both models due to the different production kinetics patterns observed as a trade-off for product titer, yields and productivity. The combined effect of gene dosage and adequate μ enables rational process development with a view to optimize *K. phaffii* RPP bioprocesses.

4.2 Introduction

Komagataella phaffii, formerly known as *Pichia pastoris*, is a widely used yeast for recombinant protein production (RPP), both for biopharmaceuticals and an increasing number of industrial enzymes of interest (Burgard *et al.*, 2017; Puxbaum *et al.*, 2015). This host has major advantages such as a wide range of genetic modification tools including genome editing toolkits are available (e.g., the CRISPR/Cas9 system); and its ability to grow to a high cell density in defined media, to perform eukaryotic post-translational modifications and to release target products extracellularly. These features in combination make *K. phaffii* a promising cell factory for industrial biotechnology (Potvin *et al.*, 2012; Vogl and Glieder, 2013; Weninger *et al.*, 2018).

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

The increasing demand for recombinant proteins has generated a multi-billion dollar market over the last few decades (Highsmith, 2015; Dewan, 2017). Therefore, important efforts are being dedicated to increase bioprocesses efficiency and profitability. Two widely reviewed complementary approaches are currently being developed to reach these goals, namely: strain engineering (Juturu and Wu, 2018; Vogl *et al.*, 2018; Zahrl *et al.*, 2017) and bioprocess optimization (Theron *et al.*, 2018; Yang and Zhang, 2018).

Using efficient promoters is essential to ensure efficient recombinant protein expression in this context. The methanol inducible alcohol oxidase promoter (P_{AOX1}) has been widely used in *K. phaffii* bioprocesses by virtue of allowing a strong and tight regulation for the recombinant expression in presence of methanol (Barrigón *et al.*, 2013; Ponte *et al.*, 2016; Vogl *et al.*, 2016). However, P_{AOX1} driven expression bioprocesses are subject to constraints derived from the use of methanol as inducer. Thus, using methanol at the industrial scale requires adopting safety measures that raise production costs and is subject to operational problems arising from heavy high heat production and oxygen demand (Prielhofer *et al.*, 2013), cell metabolic burdens (Hartner and Glieder, 2006), culture cell lysis and potential subsequent proteolysis of the target product (Mattanovich *et al.*, 2009).

Alternative promoters avoiding the use of methanol have recently been explored (Liang *et al.*, 2013; Prielhofer *et al.*, 2013; Robert *et al.*, 2019; Shen *et al.*, 2016; Vogl *et al.*, 2018). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase *GAP* promoter (P_{GAP}), which is involved in a key step of the glycolysis pathway, was the first to emerge as a benchmark for efficient protein expression on various carbon sources. Thus, by avoiding all methanol-related drawbacks, P_{GAP} based bioprocesses present relevant advantages for large-scale production (Ahmad *et al.*, 2014; Çalık *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2009).

Some authors have found copy number integration of the expression cassette in the genome, also called gene dosage, to play a central role in specific productivity (Schwarzthans *et al.*, 2016a; Vogl *et al.*, 2018). Using large numbers of gene copies results in increased productivity in some cases (Nordén *et al.*, 2011; Prielhofer *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2014) but has the opposite effect in others (Zhu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014; Cámara *et al.*, 2016). In fact, as claimed, integrating several expression cassettes in the genome may have adverse effects owing to the physiological limitations in the

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

transcription capacity of gene *AOX1*, which is governed by its transcription factors (Cámara *et al.*, 2017).

Production kinetics, the relationship between specific production rate (q_P) and specific growth rate (μ), is considered a key factor to be considered in the bioprocess development. It reflects the equilibrium between the various steps until the product is secreted, as a balance of the different processes involved during the protein synthesis, folding and secretion. This relationship is crucial to bioprocess development and optimization (Potvin *et al.*, 2012; Looser *et al.*, 2014; Çalik *et al.*, 2015). Thus, Garcia-Ortega *et al.* (2016) and Maurer *et al.* (2006) characterized P_{GAP} based strains producing an antibody fragment and obtained robust results with them in chemostat systems; so, they found q_P to increase 8 times with increasing μ . Rebnegger *et al.* (2014) examined the response of this expression system producing human serum albumin (HSA) at different specific growth rates at transcriptomic level and observed marked upregulation of genes involved in translation. However, genes of the glycolytic pathway such as *TDH3*, which is the endogenous gene regulated by P_{GAP} , was unregulated or weakly regulated, therefore suggesting that effect in the translational machinery played a major role in by causing q_P to increase with increasing μ . The results obtained with some fed-batch cultures are also consistent with synergism in these two variables (Garcia-Ortega *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2008). Therefore, because gene dosage is expected to affect production rates, one should assume that it may considerably influence production kinetics in assessing its effects.

Candida rugosa lipase (Cr1) is one of the most promising lipase enzymes for biocatalytic applications (Ken Ugo *et al.*, 2017). At least 7 genes of *C. rugosa* lipases (*CRL1-CRL7*) have been identified; also, all except *CRL6* and *CRL7* have been identified and sequenced (Ferrer *et al.*, 2001). Cr11, which accounts for about 80% of all lipase present in commercial powders, is the most widely studied (Sánchez *et al.*, 1999) Because of the difficulty involved in isolating the pure isoenzyme from the native microorganism, it has been alternatively obtained from *K. phaffii* cell factory (Valero, 2018).

For the present work, the isoenzyme *Candida rugosa* lipase 1 (Cr11) was selected as model protein to elucidate the differences in the rational design of optimal bioprocess strategies for two clones of *K. phaffii* with different gene dosage, as example of clone variability in terms of protein production. For this purpose, an accurate characterization

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

of physiological parameters and the production kinetics was firstly performed on chemostat cultures. The obtained results allowed the selection of the optimal bioprocess strategy to maximize the RPP, in order to be applied further in fed-batch cultivations, which is currently considered as the most used operational mode for industrial RPP (García-Ortega *et al.*, 2019). As a major outcome, this contribution discusses the influence of gene dosage linked to production kinetics on the determination of the optimal operating strategies with a view to maximizing bioprocess production rates and yields.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Strain construction and gene dosage

In order to get two clones with contrasting production performances, several recombinant clones with different gene dosage of *CRLI* were obtained by transforming different amounts of plasmid in which the *CRLI* expression cassette is placed under P_{GAP} regulation. According to the transformation method used, these cassettes are expected to be integrated by homologous recombination into the native P_{GAP} locus. However, constructing producer strains from *K. phaffii* may result in non-homologous end joining recombination and/or multiple insertion of the gene expression cassette, which usually expands the spectrum of clonal variability (Jiao *et al.*, 2018; Schwarzhans *et al.*, 2016b; Vogl *et al.*, 2018).

Later, transformed clones were screened in order to identify the best producer clone, which was a clone that integrated five copies of the expression cassette. Thus, it was selected for further studies in which it was compared with a clone with a single copy of gene of interest. The determination of gene dosage was performed by ddPCR. This method allows to determine the exact number of expression cassettes that were integrated in multi-copy clone (MCC), 5 copies, and to confirm the presence of only one copy of *CRLI* gene in the single-copy clone (SCC).

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

4.3.2 Strain characterization in chemostat cultures

4.3.2.1 Cell growth

The impact of gene dosage on clone production kinetics was assessed with two sets of chemostat cultures grown at different dilution rates (D). The specific growth rates spanned the range 0.025–0.15 h^{-1} . The carbon and electron balances were verified, and closure found to exceed 95% prior to reconciliation. Fig. 4.1A and Fig. 4.1B show the variation of the main physiological variables at different D in both strains.

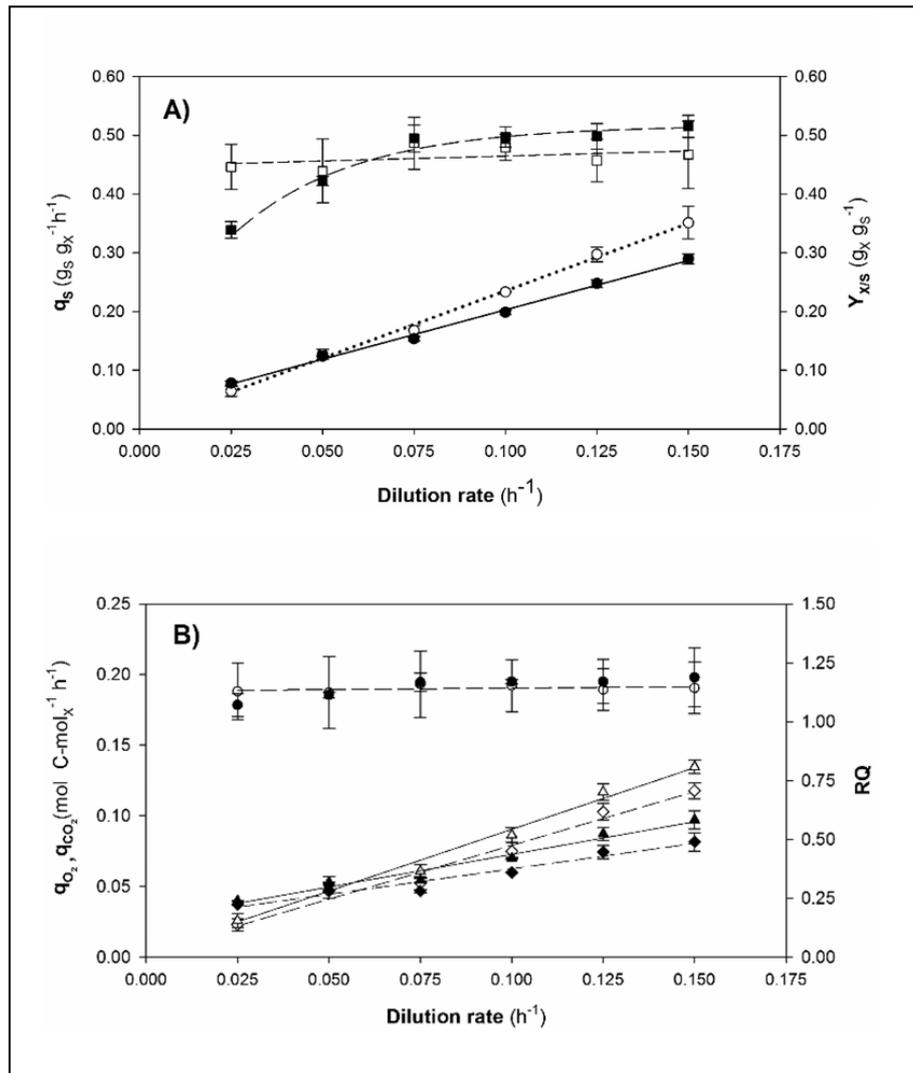


Fig. 4.1. Main physiological parameters for continuous cultures of multi-copy (black symbols) and single-copy clones (white symbols). **(A):** (●,○) Specific glucose uptake rate (q_s); (■, □) overall biomass-to-substrate yield Y_{xs} . **(B):** (◆, ◇) specific oxygen uptake rate (q_{o_2}); (▲, △) specific carbon dioxide production rate (q_{co_2}); (●,○) Respiratory quotient (RQ). Error bars represent SD of the mean values.

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

As can be seen in Fig. 4.1A, the specific substrate uptake rate (q_s) increased linearly with increasing μ . Interestingly, there were no significant differences in q_s between clones, which suggests that this rate was unaffected by gene dosage. On the other hand, the overall biomass substrate yield ($Y_{X/S}$) remained fairly constant with a value of about $0.5 \text{ g}_X \text{ g}_S^{-1}$, which is consistent with most reported values (Garcia-Ortega *et al.*, 2013; Çalik *et al.*, 2015; Adelantado *et al.*, 2017). However, MCC exhibited a slight decrease in $Y_{X/S}$ at the lowest μ values (0.05 and 0.025 h^{-1}) possibly due to require more energy for maintenance (m_s) than the single-copy strain (0.029 vs $0.0023 \text{ g}_S \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$). This factor strongly influenced $Y_{X/S}$, which is consistent with some previous studies where biomass production decreased with decreasing μ (Rebnegger *et al.*, 2016).

The lower values observed in maintenance coefficient could be expected since *K. phaffii* has been described as a robust system in terms of present lower maintenance requirements over other alternative platforms like *E. coli* (Zhu *et al.*, 2019). However, in this work, a relevant difference on m_s has been described between SCC and MCC, specifically the difference is about one order of magnitude (0.0023 and 0.029 respectively). This notable change could be related to the RPP. It exerts a strong effect on metabolic fluxes that often leads to an increase on the maintenance requirements (Carnicer *et al.*, 2012; Moser *et al.*, 2017).

Accordingly, when comparing MCC respect to SCC in relative terms, the cell maintenance requirements consumes a higher proportion of the overall energy resources obtained from carbon source uptake.

In Fig. 4.1B is shown how the specific O_2 uptake (q_{O_2}) and CO_2 production (q_{CO_2}) rates increased linearly with μ . Slight differences between both strains were observed at high μ . However, the proportion between these two specific rates are constant and consequently, the respiratory quotient (RQ) was always about 1.15.

Similarly to q_s , q_{O_2} and q_{CO_2} showed also to be strongly coupled with μ , therefore, fit into a linear equation pattern (*Herbert, Pirt, Luedeking-Piret*), which describes how is distributed a determined bioprocess parameter (specific rate) for cell growth and maintenance.

Regarding the maintenance coefficient, which is represented by the intercept, for both specific rates of each clone, a rather similar value for was obtained. Like q_s (Fig. 4.1A), MCC maintenance coefficient was slightly higher, suggesting that this difference

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

is produced due to the gene dosage effect. Thus, considering that 5 functional *CRL1* copies are integrated on MCC, it exerts a relevant demand of resources in comparison with SCC.

On the other hand, if it is compared q_{O_2} and q_{CO_2} trend for SCC and MCC, both display similar values across the μ until 0.10 h^{-1} . Nevertheless, at higher μ 's, a relatively slight decrease is detected for MCC in front of SCC. It has to be considered that RPP consumes energetic resources that drains precursors from the central carbon metabolism to sustain the productivity, which probably results into a readjustment of metabolism, being more inefficient (Peña *et al.*, 2018). For the MCC, it can be hypothesized that at low μ , Cr11 synthesis does not produce any significant metabolic readjustment, therefore, not significant changes are observed on gas-related specific rates. However, at higher μ this readjustment is shown as a reduction in the oxygen consumption and carbon dioxide production rates.

4.3.2.2 Target protein production

The specific product generation rate (q_P) and the overall product-to-biomass yield ($Y_{P/X}$) were evaluated as main key production parameters. Both are shown in Fig. 4.2.

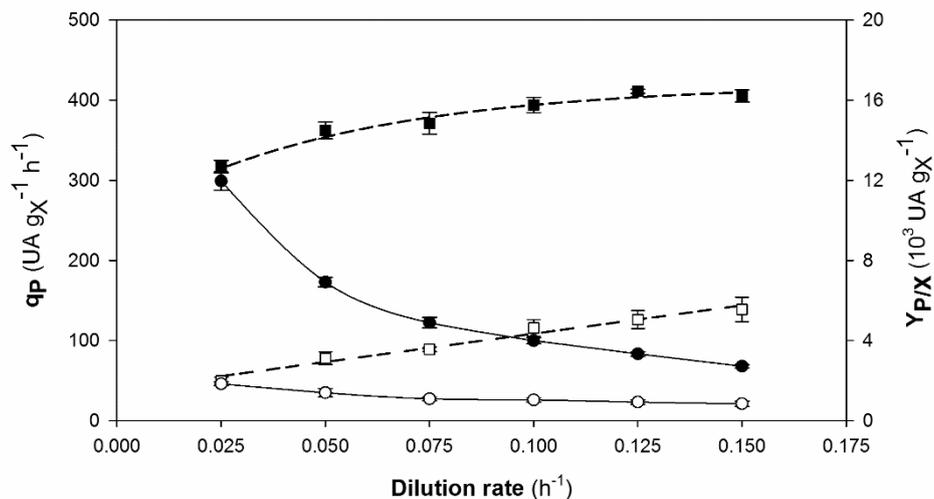


Fig. 4.2. Production parameters for chemostat cultivation at different dilution rates of the multi-copy (black symbols) and single-copy clones (white symbols). (■, □) Specific product generation rate (q_P); (●, ○) overall product-to-biomass yield coefficient ($Y_{P/X}$). Error bars represent SD of the mean values.

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

Most of the studies involving P_{GAP} have shown q_P to increase linearly with increasing μ (Garcia-Ortega *et al.*, 2016; Khasa *et al.*, 2007; Rebnegger *et al.*, 2014). In the present work, similar behaviour was observed for the SCC. In the previous studies, heterologous protein expression was strongly coupled with cell growth. With the methanol inducible promoter, P_{AOX1} , q_P may not increase with increase in μ and substrate inhibition may arise as a result (Ahmad *et al.*, 2014; Cos *et al.*, 2006; Ponte *et al.*, 2018; Schwarzhans *et al.*, 2017).

As expected, q_P was greater with MCC than with SCC (roughly 3–6 times). Some studies have shown protein production to be correlated with gene dosage and hence suggest that the number of gene copies influences q_P up an optimum number above which the synergistic effect usually is lost (Betancur *et al.*, 2017; Dagar and Khasa, 2018; Schwarzhans *et al.*, 2016a; Vogl *et al.*, 2018).

Unlike SCC, the variation of q_P for MCC with μ was not linear. In fact, a saturation effect was observed at $\mu > 0.10 \text{ h}^{-1}$, from which the q_P reaches a rather constant value at about $390 \text{ UA} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. As a result, the proportional difference in q_P between the two clones decreased with increasing μ (from roughly 6 times in the low μ range to only about 3 times in the high μ range).

During the chemostat cultures, the stability of the strains has been demonstrated by confirming the gene copy number of the expression cassette genome integration by ddPCR. Other works also has evaluated strain stability for *K. phaffii* strains in long run chemostats describing a high genetic stability of the recombinant strains (Cankorur-Cetinkaya *et al.*, 2018).

Looser *et al.* (2015) described that the strains expressing heterologous proteins under P_{GAP} normally show a linear pattern of production kinetics. Therefore, the optimum μ value for production purposes must be close to μ_{max} . However, in this work q_P for MCC results exhibited saturation at specific growth rates lower than μ_{max} , so identifying the optimum μ value should not be straightforward, which was also suggested by other authors (Maurer *et al.*, 2006; Buchetics *et al.*, 2011)

As shown in Fig. 4.2, the variation of Y_{PX} with μ differed between SC and MC clones. While the variation pattern for Y_{PX} in SCC was quite constant irrespective of D , Y_{PX} in MCC exhibited a substantial decrease in the higher D range. Thus, the highest values of Y_{PX} were obtained for low specific growth rates (0.025 and 0.05 h^{-1}).

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

Protein production kinetics reflects the equilibrium between the various steps involved in the synthesis, folding and secretion of proteins, which are influenced by a variety of physiological factors. Based on the results for MCC, one may hypothesize that some of the processes involved in protein production are subject to a bottleneck in the high μ range that leads to the saturation effect observed in the production kinetics profile. This result is consistent with previous reports where the expression system seemingly saturated during transcription, protein synthesis, post-translational modifications or even secretion (Puxbaum *et al.*, 2015; Cámara *et al.*, 2017). Further research is therefore required to improve existing knowledge about the events. In this work, we focused the efforts on the transcription analysis of key genes.

4.3.2.3 Transcriptional analysis

As suggested in the previous section, further research into subjects such as transcription analysis were deemed necessary to throw further light onto the differences in q_P variation patterns between SC and MC clones in chemostat cultures. For this purpose, relative transcript levels in relevant target genes were determined under all the culture conditions studied in chemostat cultures, using qPCR as described in the experimental procedures section.

Fig. 4.3 compares the correlation of q_P with the relative transcript levels of the genes *CRL1* and *TDH3*. Initially, *TDH3* transcription increased linearly with increasing D in both clones regardless the *CRL1* gene dosage. This result can be ascribed to the *TDH3* product corresponding to a critical node in the glucose uptake pathway, which is closely associated with biomass growth (Nocon *et al.*, 2014; Çalik *et al.*, 2015). Consequently, with high specific biomass growth rates, high fluxes through the glycolytic pathway can only be maintained by increasing production in *TDH3*. These results would be in contrast with those microarrays results presented by Rebnegger *et al.* (2014) in which the *TDH3* transcription appeared to be unregulated with the dilution rate. Remarkably, it is considered that qPCR is thought to provide increased quantitative resolution in transcription analyses of genes that present slight differences among samples (Morey *et al.*, 2006). Finally, on constancy of dilution rate (D), *TDH3* relative transcript

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

levels were essentially identical for the two strains, which suggests that the levels were influenced by D but not by $CRL1$ gene dosage.

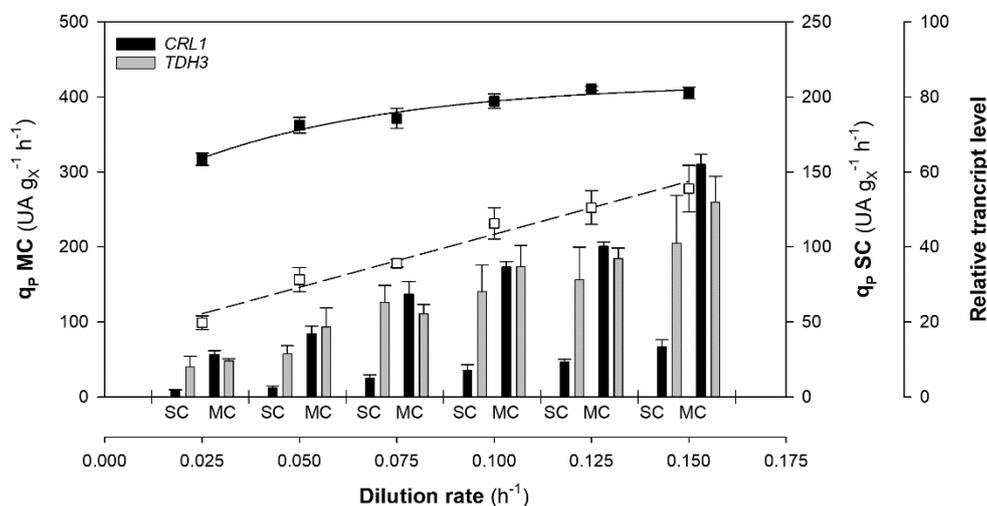


Fig. 4.3. Specific product generation rate, q_p , of the single-copy (\square) and multi-copy clones (\blacksquare); and relative transcript level of the clones for $CRL1$ (black bars) and $TDH3$ (grey bars) at each dilution rate. Error bars represent SD of the mean values.

Consistent with the results of the enzymatic activity analysis, $CRL1$ gene expression was initially greater in MC than in SC clones. In SCC, $CRL1$ relative transcript levels increased linearly with increasing D , which suggests coupling of μ , $CRL1$ relative transcript levels and q_p . These results indicate that P_{GAP} regulates genes $TDH3$ and $CRL1$ similarly and hence that the effects are strongly related with cell growth. This was not the case with MCC, however. Thus, although $CRL1$ gene expression was seemingly not affected by D , q_p clearly saturated at high D levels. This may have resulted from $CRL1$ expression coupling with biomass growth and the total amount of product secreted being limited. Therefore, there might be a bottleneck after transcription precluding conversion of all $CRL1$ transcripts into proper folded and secreted Cr11.

In Fig. 4.4, in which the transcription regulation of $TDH3$ and $CRL1$ for different μ is compared by means of plotting the quotient of the relative transcript levels between the MCC and the SCC, can be observed the above-mentioned trends. Interestingly, while no effect was observed for the $TDH3$ quotient, the positive effect of $CRL1$ gene dosage in terms of transcription is confirmed for all the culture conditions tested. According to

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

these results, therefore, no limitation in the transcription machinery for *CRLI* can be stated. Nevertheless, and despite the *CRLI* quotient of transcript levels remains constant regardless the different cultures conditions at different D , there is a significant decrease in the q_p quotient when increasing μ . This would support the hypothesis that the relevant increases achieved in terms of transcript levels due to the higher gene dosage of the target gene cannot be therefore converted into functional protein of interest.

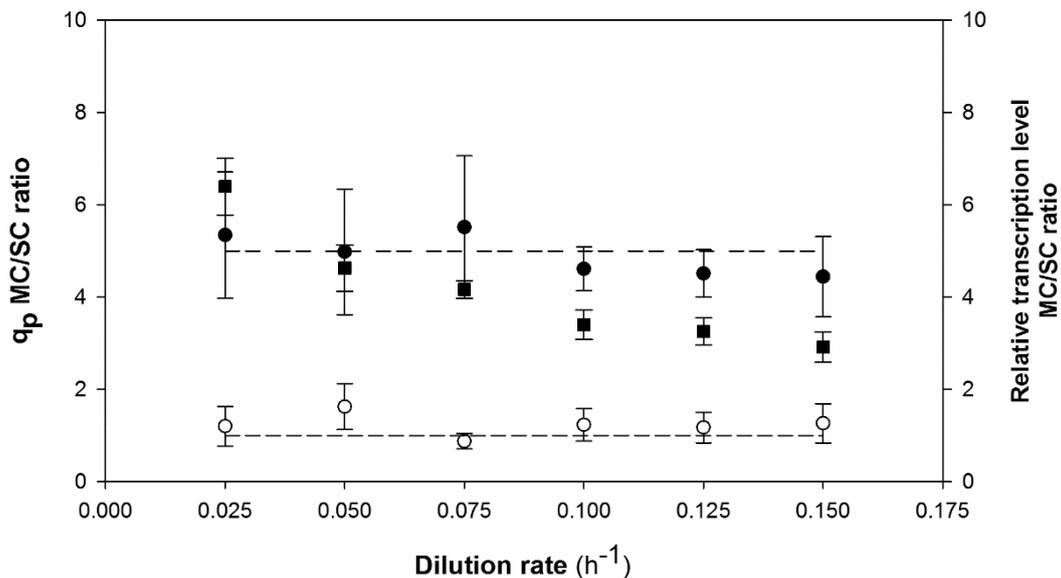


Fig. 4.4. Product and relative transcript level ratios between multi-copy and single-copy clones at different dilution rates in chemostat cultures. (■) Ratio of specific product generation rates (q_p); (●) ratio of relative transcript level for *CRLI*; (○) ratio of relative transcript level for *TDH3*. Error bars represent SD of the mean values.

Strikingly, the gene dosage effect observed in this P_{GAP} driven example of protein expression differs markedly from that reported by Cámara *et al.* (2017) for P_{AOX1} driven *Rhizopus oryzae* lipase (Rol) recombinant expression. The increased number of cassettes in Rol attenuated transcription of methanol metabolism and decreased methanol consumption, cell growth and recombinant protein production as a result.

Because *K. phaffii* may be limited in terms of protein folding, glycosylation and secretion, reduced product yields and productivity could be expected. These limitations were widely discussed by Puxbaum *et al.* (2015) and are related with ER-associated degradation (ERAD), ER-Golgi trafficking in the secretory pathway and unfolded protein

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

response (UPR). There have been some attempts at circumventing these constraints and enhancing production of various recombinant proteins. For instance, some authors have used increased gene dosages of target genes involved in product folding and secretion such as *HAC1*, *PDII* and/or *KAR2* (Bankefa *et al.*, 2018; Guan *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2014; J. Yang *et al.*, 2016). Other authors (Barrero *et.al.*, 2018) have engineered the secretion signal in order to improve translocation into the endoplasmic reticulum (ER).

No limitation in *TDH3* or *CRL1* gene transcription was observed here. With MCC, however, *CRL1* relative transcript levels increased linearly with increasing *D* but the transcripts could not be converted into functional secreted CrI1 owing to potential post-transcriptional constraints. In order to shed further light on the presumed bottlenecks, the relative expression of other target genes including *PGK*, *KAR2* and *HAC1* were examined. No limitation in chemostat cultures was observed at any *D* value, so we can conclude that the specific growth rate had no regulatory effect on the expression of these genes. Overall, this result reveals that, although no transcription limitation was identified—and hence *CRL1* gene transcription in MCC increased linearly with *D*—, this trend was inconsistent with that in the amount of product formed and hence suggests the presence of post-transcriptional constraints.

4.3.3 Fed-batch cultures

In addition to the chemostat cultures, the performance of SC and MC clones was also examined in fed-batch cultures, which is the operational mode typically used for industrial RPP. All fed-batch fermentations were conducted according to a carbon-limited pre-programmed exponential feeding profile in order to maintain a constant μ throughout the cultivation period. The ending criteria selected for these cultures was to reach a final biomass concentration about 100 g L⁻¹ to compare the experiments with a similar biomass concentration and always below maximal working volume. Thus, the culture is stopped before the bioprocess may be limited due to some biological and physical restrictions, such as heat and mass transfer, and lack of homogeneity, keeping the pseudo-stationary state in the system. μ spanned the range 0.05–0.15 h⁻¹ and included an additional condition of 0.025 h⁻¹ for MCC.

Fig. 4.5 presents the time-course of total lipolytic activity in the fed-batch cultures with SC and MC clones. Although the figure only shows the results for the fed phase, it should be noted that lipolytic activity at the end of the batch phase was roughly 3.5 times higher with MC clone. Since biomass grew at the highest possible μ during the batch phase, these results seemingly confirm the effect of gene dosage on high μ cultures suggested in the previous section.

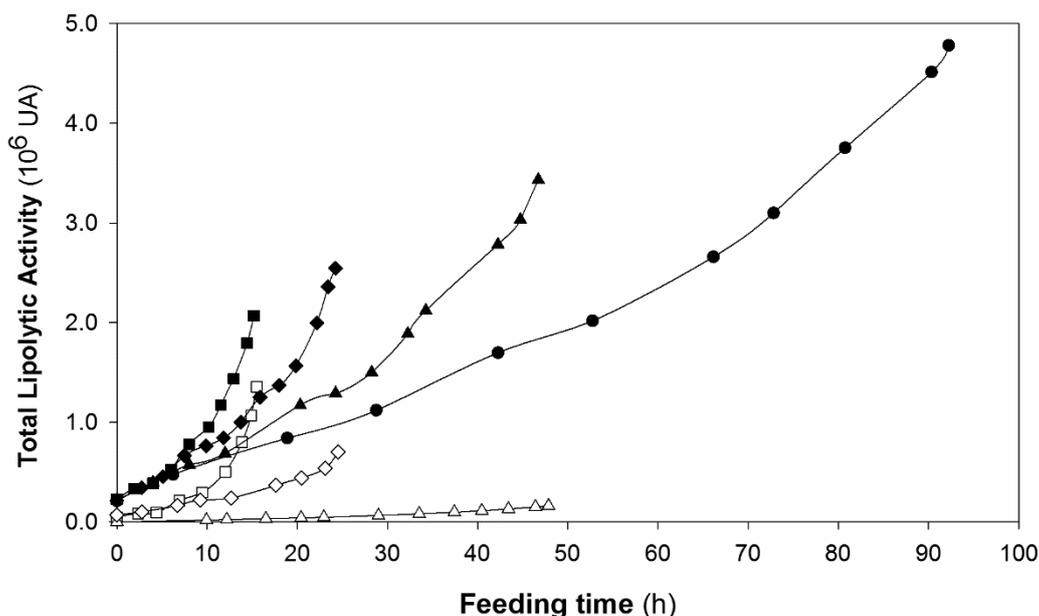


Fig. 4.5. Variation of the total lipolytic activity in fed-batch cultures at different specific growth rates (μ) with the multi-copy (black symbols) and single-copy clones (white symbols). Specific growth rates: (●) 0.025 h^{-1} , (▲) 0.05 h^{-1} , (◆) 0.10 h^{-1} , (■) 0.15 h^{-1} , (△) 0.05 h^{-1} , (◇) 0.10 h^{-1} , (□) 0.15 h^{-1} .

As detailed in Table 4.1 lipolytic activity peaked at 372 UA mL^{-1} at the highest μ value with SCC and at 1009 UA mL^{-1} at low μ (0.05 h^{-1}) with MCC.

Based on these results for MCC, an additional fermentation run at 0.025 h^{-1} was used to confirm that CrI1 production would peak at the lowest μ level. As hypothesized, lipolytic activity (1414 UA mL^{-1}) was highest under those conditions and 4 times greater than the highest value for SCC. A systematic comparison based on the main production parameters obtained at the different operating conditions followed with the two producer clones is presented in Table 4.1.

In Fig. 4.6 the mean values of q_P and Y_{PX} for the fed-batch cultures at different μ values are depicted. As expected for consistency with the chemostat results, q_P increased

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

linearly with increasing μ in SCC but exhibited saturation in MCC. The $Y_{P/X}$ variation pattern was similar to that for the chemostat cultures; thus, $Y_{P/X}$ decreased exponentially with increasing μ in MCC but remained fairly constant in SCC.

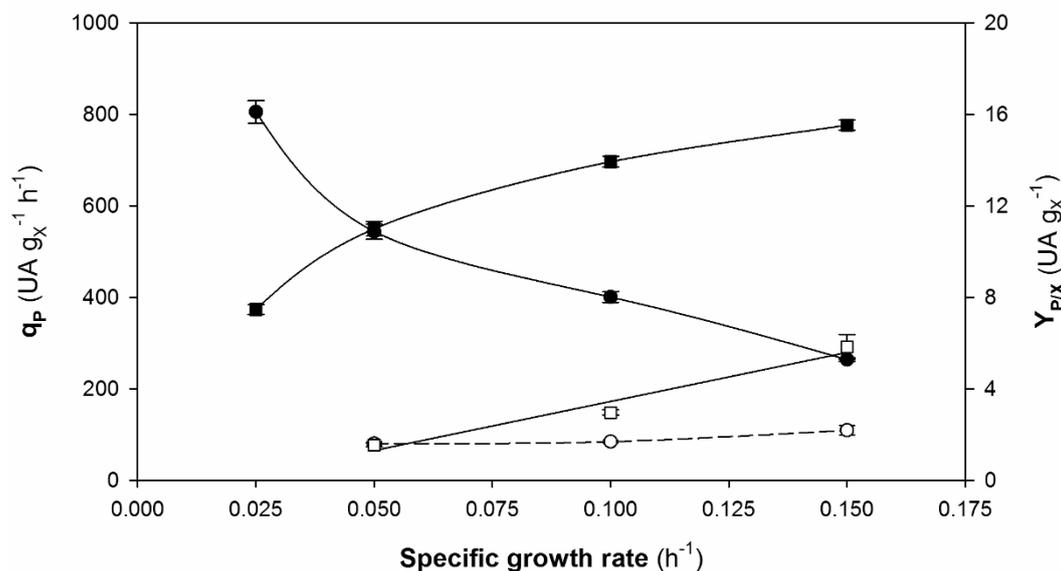


Fig. 4.6. Production parameters for fed-batch cultures at different specific growth rates of the multi-copy (black symbols) and single-copy clones (white symbols). (\blacksquare , \square) Specific product generation rate (q_P); (\bullet , \circ) overall product-to-biomass yield coefficient ($Y_{P/X}$). Error bars show SD from regression analysis.

As in the chemostat cultures, q_P was higher with MCC than with SCC, and their ratio (3–6) was dependent on the μ applied. Although the overall patterns for the two operational modes were similar, q_P and $Y_{P/X}$ were substantially higher for the fed-batch cultures.

Fed-batch cultivation usually ends when biomass production reaches a critical concentration limit imposed by biological and physical restrictions. As a result, growth-associated biomass in fermentation processes is an unavoidable by-product and requires controlling the biomass growth in order not to exceed the limiting concentration. Thus, the lower μ is, the longer a bioprocess can be extended to increase product titers until the termination criterion is fulfilled.

In Table 4.1 are gathered the main production parameters obtained in fed-batch cultures for the single-copy and multi-copy clones. Product titer, yields and productivities are detailed as key performance indexes along the different specific growth rates applied.

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

Some aspects can be assessed for discussion, mainly relating to the synergistic effect of μ and q_p , and how these two specific rates affect the bioprocess efficiency.

Table 4.1. Main production parameters obtained with the single-copy and multi-copy clones at different specific growth rates (μ) in fed-batch cultures. For the comparing rows, cultivation at the lowest μ of the single-copy clone is taken as reference.

Nominal μ (h ⁻¹)	Single-copy clone			Multi-copy clone			
	0.050	0.100	0.150	0.025	0.050	0.100	0.150
Experimental μ (h ⁻¹)	0.048	0.088	0.133	0.023	0.051	0.087	0.147
Product Titer (UA mL ⁻¹)	180	195	372	1414	1009	827	600
Product Titer increase (%)	-	+8%	+107%	+685%	+460%	+359%	+233%
q_p (UA g _x ⁻¹ h ⁻¹)	77	149	292	374	550	697	777
q_p increase (%)	-	+92%	+277%	+383%	+611%	+800%	+903%
Q_p (10 ³ UA L ⁻¹ h ⁻¹)	3.3	6.3	22.9	14.6	20.1	31.1	34.9
Q_p increase (%)	-	+87%	+586%	+337%	+502%	+831%	+943%
$Y_{P/S}$ (10 ³ UA g _S ⁻¹)	0.75	0.71	0.94	7.33	5.54	3.72	2.61
$Y_{P/S}$ increase (%)	-	-5%	+26%	+880%	+640%	+398%	+248%
$Y_{P/X}$ (10 ³ UA g _X ⁻¹)	1.61	1.70	2.19	16.1	10.9	8.02	5.28
$Y_{P/X}$ increase (%)	-	+6%	+36%	+902%	+577%	+399%	+229%

† μ , specific growth rate; q_p , specific product generation rate; Q_p , volumetric productivity; $Y_{P/S}$, overall product-to-substrate yield; $Y_{P/X}$, overall product-to-biomass yield.

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

Regarding the production kinetics, that is, how affects μ on q_P , it was demonstrated that the kinetic pattern is markedly different for the MCC and SCC. The MCC exhibited a 30% q_P decrease when μ decreased from 0.15 to 0.05 h⁻¹, by effect of its rather flat production kinetics curve at the highest μ , as shown in Fig. 4.6 and Table 4.1. In a similar comparison for the SCC, q_P decreased by 70 % from 0.15 to 0.05 h⁻¹. It is due to the more marked coupling of q_P to the cell growth.

As expected, productivities (Q_P) varied on μ similarly to that observed for q_P in MCC and SCC. Consequently, the rational selection of μ to optimize the bioprocess performance would require a trade-off.

In terms of parameters focused on production and yield, the SCC at 0.15 h⁻¹ reached product titers 107 % higher compared to the obtained at 0.05 h⁻¹. Accordingly, $Y_{P/S}$ and $Y_{P/X}$ increased a 26 % and 36 % respectively. Therefore, high μ should be clearly recommended for production kinetics patterns similarly to SCC.

On the contrary, for the MCC, product titer reached a 68 % increase when μ decreased from 0.15 to 0.05 h⁻¹. Strikingly, titer was even better at 0.025 h⁻¹, equivalent to a 140 % increase compared to 0.15 h⁻¹, which led to important increases in terms of $Y_{P/S}$ and $Y_{P/X}$ (180 % and 204 % respectively).

4.3.4 Rational-based bioprocess design

The results previously exposed supports the idea that combined effect of μ and gene dosage on P_{GAP} -based *K. phaffii* clones expressing *CRL1* can be used to design optimal operating strategies.

In this way, the results obtained from chemostat cultures reveals that q_P increases linearly with increasing specific growth rate in SCC but exhibits a nonlinear pattern suggestive of saturation of the production kinetics in MCC. Interestingly, q_P is considerably higher with MCC than with SCC (3 to 6 times depending on the particular μ value). These results confirm that gene dosage impacts directly on the production kinetic profile, both in the levels of titer achieved as well as the profile pattern. From the transcription analysis performed, one can hypothesize the presence of a potential bottleneck after transcription.

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

The continuous cultures were used as tool to the design of optimized fed-batch strategies, since this operational mode is the most widely operational mode used for industrial RPP. Therefore, a rational-based bioprocess design can be carried out considering the effect of gene dosage and μ on the bioprocess efficiency. Although trends were similar as those observed in the chemostat cultures, there were some differences, especially with MCC. Saturation was more marked than in the chemostat tests and a plateau was reached in the higher μ range.

When the data for the main production parameters in Table 4.1 are jointly considered, the different trends in production kinetics and yields can be useful to identify the best operational strategies by characterizing producer clones. Usually, when μ has a strong impact on specific production rates and yields (e.g., with SCC), a high μ level should be used to increase q_P and $Y_{P/X}$. On the other hand, if the impact of μ is weak (e.g., with MCC), low to moderate μ values can help to extend the bioprocess time until the limit imposed by a critical amount of biomass is reached. In this case, these differences have been caused by the different gene dosage.

Summing up, it can be stated as main outcome of this contribution that the production kinetics of the cell factory and specific growth rate must be jointly considered to tailor operating strategies to production clones for maximizing expression in *K. phaffii*. This work presents how a comprehensively elucidation of the gene dosage effect on production kinetics, towards to overall optimize the RPP bioprocesses can be afforded. Hence, properly understanding these features and their correlation provides a more rational, robust knowledge of the behaviour of cell factories and allows bioprocesses to be engineered for greater efficiency.

4.4 References

- Adelantado, N., Tarazona, P., Grillitsch, K., García-Ortega, X., Monforte, S., Valero, F., *et al.* (2017) The effect of hypoxia on the lipidome of recombinant *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **16**: 86.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., and Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 5301–5317.
- Bankefa, O. E., Wang, M., Zhu, T., and Li, Y. (2018) Hac1p homologues from higher eukaryotes can improve the secretion of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* **40**: 1149–1156.
- Barrero, J. J., Casler, J. C., Valero, F., Ferrer, P., and Glick, B. S. (2018) An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **17**: 161.
- Barrigón, J. M., Montesinos, J. L., and 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? *Biochem Eng J* **75**: 47–54.
- Betancur, M. O., Reis, V. C. B., Nicola, A. M., De Marco, J. L., de Moraes, L. M. P., and Torres, F. A. G. (2017) Multicopy plasmid integration in *Komagataella phaffii* mediated by a defective auxotrophic marker. *Microb Cell Fact* **16**: 99.
- Buchetics, M., Dragosits, M., Maurer, M., Rebnegger, C., Porro, D., Sauer, M., *et al.* (2011) Reverse engineering of protein secretion by uncoupling of cell cycle phases from growth. *Biotechnol Bioeng* **108**: 2403–2412.
- Burgard, J., Valli, M., Graf, A. B., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2017) Biomarkers allow detection of nutrient limitations and respective supplementation for elimination in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Microb Cell Fact* **16**: 117.
- Çalık, P., Ata, Ö., Güneş, H., Massahi, A., Boy, E., Keskin, A., *et al.* (2015) Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochem Eng J* **95**: 20–36.
- Cámara, E., Albiol, J., and Ferrer, P. (2016) Droplet digital PCR-aided screening and characterization of *Pichia pastoris* multiple gene copy strains. *Biotechnol Bioeng* **113**: 1542–1551.
- Cámara, E., Landes, N., Albiol, J., Gasser, B., Mattanovich, D., and Ferrer, P. (2017) Increased dosage of AOX1 promoter-regulated expression cassettes leads to transcription attenuation of the methanol metabolism in *Pichia pastoris*. *Sci Rep* **7**: 44302.
- Cankorur-Cetinkaya, A., Narraido, N., Kasavi, C., Slater, N. K. H., Archer, D. B., and Oliver, S. G. (2018) Process development for the continuous production of heterologous proteins by the industrial yeast, *Komagataella phaffii*. *Biotechnol Bioeng* **115**: 2962–2973.

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

- Carnicer, M., Ten Pierick, A., Van Dam, J., Heijnen, J.J., Albiol, J., Van Gulik, W., and Ferrer, P. (2012) Quantitative metabolomics analysis of amino acid metabolism in recombinant *Pichia pastoris* under different oxygen availability conditions. *Microb Cell Fact* **11**:83.
- Chang, S.W., Lee, G.C., and Shaw, J.F. (2006) Codon optimization of *Candida rugosa* lip1 gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *J Agric Food Chem* **54**: 815–822.
- Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J.L., Ferrer, P., Cregg, J.M., and Valero, F. (2005) Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *J Biotechnol* **117**: 321–335.
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., and Valero, F. (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microb Cell Fact* **5**: 17.
- Dagar, V. K., and Khasa, Y. P. (2018) Combined effect of gene dosage and process optimization strategies on high-level production of recombinant human interleukin-3 (hIL-3) in *Pichia pastoris* fed-batch culture. *Int J Biol Macromol* **108**: 999–1009.
- Dewan, S. S. (2017) *Global markets for enzymes in industrial applications*. BCC Res (BIO030J).
- Ferrer, P., Montesinos, J. L., Valero, F., and Solà, C. (2001) Production of Native and Recombinant Lipases by *Candida rugosa*: A Review. *Appl Biochem Biotechnol* **95**: 221–256.
- Garcia-Ortega, X., Adelantado, N., Ferrer, P., Montesinos, J. L., and Valero, F. (2016) A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*: From specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. *Process Biochem* **51**: 681–691.
- García-Ortega, X., Cámara, E., Ferrer, P., Albiol, J., Montesinos-Seguí, J. L., and Valero, F. (2019) Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol-free GAP promoter. Where do we stand? *N Biotechnol* **53**: 24–34.
- Garcia-Ortega, X., Ferrer, P., Montesinos, J. L., and Valero, F. (2013) Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter. *Biochem Eng J* **79**: 172–181.
- Garcia-Ortega, X., Valero, F., and Montesinos-Seguí, J. L. (2017) Physiological state as transferable operating criterion to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris* through oxygen limitation. *J Chem Technol Biotechnol* **92**: 2573–2582.
- Guan, B., Chen, F., Su, S., Duan, Z., Chen, Y., Li, H., and Jin, J. (2016) Effects of co-overexpression of secretion helper factors on the secretion of a HSA fusion protein (IL2-HSA) in *Pichia pastoris*. *Yeast* **33**: 587–600.
- Hartner, F. S., and Glieder, A. (2006) Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact* **5**: 39.

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

- Highsmith, J. (2015) *Biological Therapeutic Drugs: Technologies and Global Markets*. BCC Res.(BIO079C)
- Jiao, L., Zhou, Q., Su, Z., Xu, L., and Yan, Y. (2018) High-level extracellular production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* via a strategy combining optimization of gene-copy number with co-expression of ERAD-related proteins. *Protein Expr Purif* **147**: 1–12.
- Juturu, V., and Wu, J. C. (2018) Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris* : Latest Research Progress and Applications. *ChemBioChem*, **19**: 7–21.
- Ken Ugo, A., Vivian Amara, A., CN, I., and Kenechuwku, U. (2017) Microbial Lipases: A Prospect for Biotechnological Industrial Catalysis for Green Products: A Review. *Ferment Technol* **06**.
- Khasa, Y. P., Khushoo, A., Srivastava, L., and Mukherjee, K. J. (2007) Kinetic studies of constitutive human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) expression in continuous culture of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, **29**: 1903–1908.
- Landes, N., Gasser, B., Vorauer-Uhl, K., Lhota, G., Mattanovich, D., and Maurer, M. (2016) The vitamin-sensitive promoter *P_{THII1}* enables pre-defined autonomous induction of recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* **113**: 2633–2643.
- Liang, S., Zou, C., Lin, Y., Zhang, X., and Ye, Y. (2013) Identification and characterization of PGCW14 : a novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* **35**: 1865–1871.
- Liu, H., Qin, Y., Huang, Y., Chen, Y., Cong, P., and He, Z. (2014) Direct evaluation of the effect of gene dosage on secretion of protein from yeast *Pichia pastoris* by expressing EGFP. *J Microbiol Biotechnol* **24**: 144–151.
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., *et al.* (2015) Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv* **33**: 1177–1193.
- Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J., Dragosits, M., Redl, A., Maurer, M., *et al.* (2009) Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **8**: 29.
- Maurer, M., Kühleitner, M., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2006) Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **5**: 37.
- Morey, J. S., Ryan, J. C., and Dolah, F. M. (2006) Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online* **8**: 175–193.
- Moser, J.W., Prielhofer, R., Gerner, S.M., Graf, A.B., Wilson, I.B.H., Mattanovich, D., and Dragosits, M. (2017) Implications of evolutionary engineering for growth and recombinant protein production in methanol-based growth media in the yeast *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **16**: 49.
- Nocon, J., Steiger, M. G., Pfeffer, M., Sohn, S. B., Kim, T. Y., Maurer, M., *et al.* (2014) Model based engineering of *Pichia pastoris* central metabolism enhances recombinant protein production. *Metab Eng* **24**: 129–138.

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

- Nordén, K., Agemark, M., Danielson, J. Å. H., Alexandersson, E., Kjellbom, P., and Johanson, U. (2011) Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol* **11**: 47.
- Peña, D.A., Gasser, B., Zanghellini, J., Steiger, M.G., and Mattanovich, D. (2018) Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metab Eng* **50**: 2–15.
- Ponte, X., Barrigón, J. M., Maurer, M., Mattanovich, D., Valero, F., and Montesinos-Seguí, J. L. (2018) Towards optimal substrate feeding for heterologous protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella spp*) fed-batch processes under P_{AOX1} control: a modeling aided approach. *J Chem Technol Biotechnol* **93**: 3208-3218.
- Ponte, X., Montesinos-Seguí, J. L., and Valero, F. (2016) Bioprocess efficiency in *Rhizopus oryzae* lipase production by *Pichia pastoris* under the control of P_{AOX1} is oxygen tension dependent. *Process Biochem* **51**: 1954–1963.
- Potvin, G., Ahmad, A., and Zhang, Z. (2012) Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J* **64**: 91–105.
- Prielhofer, R., Maurer, M., Klein, J., Wenger, J., Kiziak, C., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2013) Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **12**: 5.
- Puxbaum, V., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2015) Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 2925–38.
- Rebnegger, C., Graf, A. B., Valli, M., Steiger, M. G., Gasser, B., Maurer, M., and Mattanovich, D. (2014) In *Pichia pastoris*, growth rate regulates protein synthesis and secretion, mating and stress response. *Biotechnol J* **9**: 511–525.
- Rebnegger, C., Vos, T., Graf, A. B., Valli, M., Pronk, J. T., Daran-Lapujade, P., and Mattanovich, D. (2016) *Pichia pastoris* exhibits high viability and a low maintenance energy requirement at near-zero specific growth rates. *Appl Environ Microbiol* **82**: 4570–4583.
- Robert, J. M., Garcia-Ortega, X., Montesinos-Seguí, J. L., Freire, D. M. G., and Valero, F. (2019) Continuous operation, a realistic alternative to fed-batch fermentation for the production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* under the constitutive promoter PGK in *Pichia pastoris*. *Biochem Eng J* **147**: 39–47.
- Sánchez, A., Ferrer, P., Serrano, A., Pernas, M. A., Valero, F., Rúa, M. L., *et al.* (1999) Characterization of the lipase and esterase multiple forms in an enzyme preparation from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *Enzyme Microb Technol* **25**: 214–223.
- Schwarzahns, J. P., Luttermann, T., Geier, M., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2017) Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Adv* **35**: 681–710.
- Schwarzahns, J. P., Wibberg, D., Winkler, A., Luttermann, T., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2016a) Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microb Cell Fact* **15**: 84.

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

- Schwarzahns, J. P., Wibberg, D., Winkler, A., Luttermann, T., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2016b) Non-canonical integration events in *Pichia pastoris* encountered during standard transformation analysed with genome sequencing. *Sci Rep* **6**: 38952.
- Shen, W., Xue, Y., Liu, Y., Kong, C., Wang, X., Huang, M., *et al.* (2016) A novel methanol-free *Pichia pastoris* system for recombinant protein expression. *Microb Cell Fact* **15**: 178.
- Theron, C. W., Berrios, J., Delvigne, F., and Fickers, P. (2018) Integrating metabolic modeling and *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**: 63–80.
- Valero, F. (2018) Recent Advances in *Pichia pastoris* as Host for Heterologous Expression System for Lipases: A Review. In *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, pp. 205–216.
- Vogl, T., Gebbie, L., Palfreyman, R. W., and Speight, R. (2018) Effect of Plasmid Design and Type of Integration Event on Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol* **84**: e02712-17.
- Vogl, T., and Glieder, A. (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *N Biotechnol* **30**: 385–404.
- Vogl, T., Sturmberger, L., Fauland, P. C., Hyden, P., Fischer, J. E., Schmid, C., *et al.* (2018) Methanol independent induction in *Pichia pastoris* by simple derepressed overexpression of single transcription factors. *Biotechnol Bioeng* **115**: 1037–1050.
- Vogl, T., Sturmberger, L., Kickenweiz, T., Wasmayer, R., Schmid, C., Hatzl, A. M., *et al.* (2016) A Toolbox of Diverse Promoters Related to Methanol Utilization: Functionally Verified Parts for Heterologous Pathway Expression in *Pichia pastoris*. *ACS Synth Biol* **5**: 172–186.
- Weninger, A., Fischer, J. E., Raschmanová, H., Kniely, C., Vogl, T., and Glieder, A. (2018) Expanding the CRISPR/Cas9 toolkit for *Pichia pastoris* with efficient donor integration and alternative resistance markers. *J Cell Biochem* **119**: 3183–3198.
- Yang, J., Lu, Z., Chen, J., Chu, P., Cheng, Q., Liu, J., *et al.* (2016) Effect of cooperation of chaperones and gene dosage on the expression of porcine PGLYRP-1 in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 5453–5465.
- Yang, Z., and Zhang, Z. (2018) Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv* **36**: 182–195.
- Zahrl, R. J., Peña, D. A., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2017) Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res* **17**.
- Zhang, A. L., Luo, J. X., Zhang, T. Y., Pan, Y. W., Tan, Y. H., Fu, C. Y., and Tu, F. zhi. (2009) Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep* **36**: 1611–1619.
- Zhao, W., Wang, J., Deng, R., and Wang, X. (2008) Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**: 189–195.

4. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

- Zhu, T., Guo, M., Tang, Z., Zhang, M., Zhuang, Y., Chu, J., and Zhang, S. (2009) Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol* **107**: 954–63.
- Zhu, T., Sun, H., Li, P., Xue, Y., Li, Y., and Ma, Y. (2014) Constitutive expression of alkaline β -mannanase in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem* **49**: 2025–2029.
- Zhu, T., Sun, H., Wang, M., and Li, Y. (2019) *Pichia pastoris* as a Versatile Cell Factory for the Production of Industrial Enzymes and Chemicals: Current Status and Future Perspectives. *Biotechnol J* **14**: 1800694.

5 Aplicación de la deprivación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

5.1 Introducción

En los últimos años, la tecnología de producción de proteínas recombinantes (RPP) y metabolitos ha dado lugar a un mercado multimillonario que cuenta con una gran variedad de productos aplicables a una amplia gama de actividades relacionadas con la industria alimentaria, de detergentes, papelera, química, cosmética y farmacéutica. De esta última, se han descrito más de 400 productos disponibles en el mercado en la actualidad (Sanchez-Garcia *et al.*, 2016; Vieira Gomes *et al.*, 2018). El impacto económico global producido de dichas actividades se estimó en aproximadamente 143.5 mil millones de USD en el 2014, con una previsión al alza hasta el 2020 (Porro *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2017).

Pichia pastoris (*Komagataella phaffii*), es una emergente factoría celular considerada como una herramienta eficiente y versátil para la elaboración de una gran variedad de productos biotecnológicos que incluyen proteínas recombinantes y metabolitos de diverso origen (Gasser *et al.*, 2013; Peña *et al.*, 2018). De entre las principales características que hacen a *P. pastoris* un hospedero ideal para los usos previamente mencionados se incluyen un rápido crecimiento en medio definido, la disponibilidad de herramientas de manipulación genética y la habilidad de realizar modificaciones postraduccionales, así como secretar productos al medio extracelular (Vogl and Glieder, 2013; Gasser and Mattanovich, 2018; Weninger *et al.*, 2018).

Las tendencias actuales en la ingeniería de bioprocesos apuntan a un enfoque conceptual con el objetivo de diseñar nuevas estrategias basadas tanto en las propiedades fisiológicas de la factoría celular como en la caracterización de los principales parámetros de bioproceso, generalmente función del producto a expresar (Nocon *et al.*, 2014; Looser *et al.*, 2015; García-Ortega *et al.*, 2019). Se ha descrito que para factorías celulares como *P. pastoris* y *S. cerevisiae* el estrés celular pueden provocar un efecto positivo en la formación de proteínas recombinantes o facilitar su síntesis (Gasser *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014). Así, estudios realizados sobre el estrés celular producido por la alteración de diferentes parámetros de bioproceso como la disminución de la temperatura, incremento de osmolaridad y la limitación de oxígeno han permitido obtener con éxito un incremento en los rendimientos y productividades en *P. pastoris* (Baumann *et al.*, 2008; Dragosits *et al.*, 2009, 2010, 2011). Por otra parte, la restricción de la fuente de carbono

5. Aplicación de la deprivación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

también ha sido objeto de estudio por los efectos positivos generados sobre la RPP. Kern *et al.* (2007) observó que durante la expresión del gen de una oxidasa alternativa (AOD) bajo el control del promotor de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (P_{GAP}), después del agotamiento de la fuente de carbono en cultivos en matraz, se detectó un incremento significativo de la producción de Aod; sin embargo, no se determinó el motivo de dicho incremento, limitándose a constatar que este tipo de comportamiento había sido detectado en casos anteriores. Estos resultados sentaron las bases de posteriores estudios en los cuales se llevó a cabo el establecimiento de esta estrategia de cultivo en cultivos en biorreactor. Concretamente, Garcia-Ortega *et al.* (2016), adaptó esta estrategia en cultivos operados en modo de operación *fed-batch* para la producción de un fragmento del anticuerpo Fab 2F5. En éstos, se modificó el perfil de adición exponencial preprogramado estándar, utilizado para mantener una velocidad específica de crecimiento (μ) constante, mediante la inclusión de periodos cortos de parada de la alimentación. Como los cultivos normalmente ya se encuentran en condiciones limitantes de carbono, una parada en la adición provoca que este aporte se agote inmediatamente produciendo un efecto de deprivación de carbono sobre las células conocido como *carbon-starving*. Este estudio reveló un importante incremento tanto en la productividad volumétrica (+29.5 %) como en los rendimientos del producto respecto al sustrato ($Y_{P/S}$, +41.9 %) y a la biomasa ($Y_{P/X}$, +46.6 %) asociados a la producción de un fragmento del anticuerpo Fab 2F5.

La aplicación de la restricción o deprivación de fuente de carbono no sólo se restringe a su estudio en cultivos en modo de operación en *fed-batch*. Los retentostatos, un tipo de cultivo en continuo que resulta de una modificación de los quimiostatos, permite trabajar a velocidades específicas de crecimiento cercanas a cero (Ercan *et al.*, 2015). Esta característica ha sido ampliamente aprovechada para simular condiciones calóricas altamente restrictivas debido a que conforme incrementa la concentración de biomasa, disminuye la disponibilidad de sustrato (Boender *et al.*, 2011). El estudio del comportamiento celular de *P. pastoris* bajo este tipo de cultivos se ha considerado con el objetivo de desacoplar la formación de producto del crecimiento celular y fortalecer así el uso de condiciones de deprivación de fuente de carbono como herramienta biotecnológica (Rebnegger *et al.*, 2016).

Las lipasas de *Candida rugosa* (CrI) son ampliamente conocidas por ser enzimas de interés industrial con diversas aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria,

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

cosmética y energética (Barriuso *et al.*, 2016). Se ha descrito la presencia de 8 genes responsables de la síntesis de isoenzimas con actividad lipolítica, de los cuales 5 han sido caracterizados bioquímicamente (Kuo *et al.*, 2015). En específico dos se encuentran en mayor proporción en los extractos celulares (Crl1 y Crl3), siendo Crl1 la mayoritaria (Barriuso *et al.*, 2016). En concreto, se ha estudiado la isoenzima Crl1, siendo ampliamente caracterizada y producida de forma heteróloga mediante el uso de la factoría celular *P. pastoris* (Chang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2016; Hao *et al.*, 2019).

El presente trabajo tiene como objetivo determinar las potenciales aplicaciones del efecto de las condiciones restrictivas de fuente de carbono, concretamente haciendo uso del *carbon-starving* en cultivos en *fed-batch*. Para ello, en base a la metodología desarrollada por el grupo de investigación, se consideró necesario primero caracterizar el efecto de esta estrategia sobre el comportamiento fisiológico haciendo uso de cultivos operados en quimiostato. Los cuales permitieron obtener resultados altamente reproducibles y robustos tal como se describió en el capítulo anterior; sobre todo, al momento de llevar a cabo el análisis transcripcional mediante la secuenciación del transcriptoma (RNAseq), el cual fue introducido como novedad en el presente trabajo frente al uso de la qPCR.

El estudio se llevó a cabo con dos cepas recombinantes de *P. pastoris* que expresan la lipasa 1 de *C. rugosa* bajo el control del promotor *GAP* con diferente dosis génica. De este modo, esta variabilidad permitirá analizar si el efecto del *carbon-starving* afecta de forma diferenciada a clones con una variada performance fisiológica y de producción. También se pretendió llevar a cabo un diseño racional en el desarrollo del bioproceso, realizando la determinación de las condiciones de operación más adecuadas para cada cepa en función de los cambios observados en los patrones cinéticos y fisiológicos de cada clon.

5. Aplicación de la deprivación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Cultivos en quimiostato

5.2.1.1 Caracterización del efecto producido por la restricción de fuente de carbono en cultivos en quimiostato

Para el presente trabajo, los clones utilizados fueron los mismos del capítulo 4, un clon con una copia (*single-copy clone*, SCC) y otro con 5 copias (*multicopy-clone*, MCC) insertadas del gen heterólogo en el genoma.

La aplicación del *carbon-starving* ha mostrado un efecto positivo en cultivos en *fed-batch* sobre la producción de fragmento del anticuerpo Fab 2F5 (Garcia-Ortega *et al.*, 2016). Sin embargo, en dicho estudio no se determinan las bases fisiológicas de los efectos derivados de la aplicación de esta estrategia de operación, ya que este tipo de cultivos cuenta con una población celular heterogénea que impide una correcta caracterización del sistema. Por lo tanto, para estudiar el efecto producido por condiciones altamente restrictivas de carbono sobre el comportamiento celular en la producción de Crl1, se llevó a cabo la adaptación de un cultivo en quimiostato estándar. De este modo se aplicó la estrategia de *carbon-starving* sobre una población celular homogénea, con el objetivo de llegar a obtener resultados robustos y reproducibles.

El estudio se inició llevando a cabo una operación en quimiostato a velocidad de específica de crecimiento (μ) de 0.15 h^{-1} , la cual fue seleccionada debido a corresponder aproximadamente con la q_P máxima (q_{Pmax}) obtenida en el SCC, mientras que para el MCC este valor se encuentra en el rango máximo de saturación de la q_P . Para asegurar llegar al estado estacionario se analizaron muestras de actividad desde los 3 tiempos de residencia hasta confirmar la estabilidad de este parámetro, lo cual se consiguió mayoritariamente a los 5 tiempos de residencia. Una vez alcanzado dicho estado, se procedió a parar los caudales de entrada y salida del fermentador durante 90 minutos. Así se impidió la entrada de fuente de carbono y por lo tanto indujeron las condiciones restrictivas de fuente de carbono en una población de células que se encontraban bajo el mismo estado fisiológico. Finalmente, se reconectaron los caudales de alimentación y salida para que una vez alcanzado nuevamente el estado estacionario verificar que se

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

mantuviese la misma actividad enzimática y descartar de ese modo posibles efectos epigenéticos sobre la síntesis de Cr11.

En la Fig. 5.1 se muestra el progreso de la actividad enzimática una vez ejercido el periodo de restricción de carbono después de alcanzar el estado estacionario tanto para los clones SCC y MCC. Se tomaron muestras cada 15 minutos para monitorizar tanto la actividad enzimática como la concentración de biomasa expresada en peso seco (*dry cell weight*, DCW). Para el presente estudio, se utilizó el triple de biomasa (75 g l^{-1}) en comparación a los quimiostatos del capítulo anterior (25 g l^{-1}) con la finalidad de intentar conseguir una mayor precisión en las variaciones detectadas entre los diferentes puntos de muestreo, evitando posibles confusiones debidas al efecto de ruido y/o a la falta de precisión del análisis de actividad, tal como se observó previamente en ensayos previos realizados a 25 g l^{-1} (datos no mostrados).

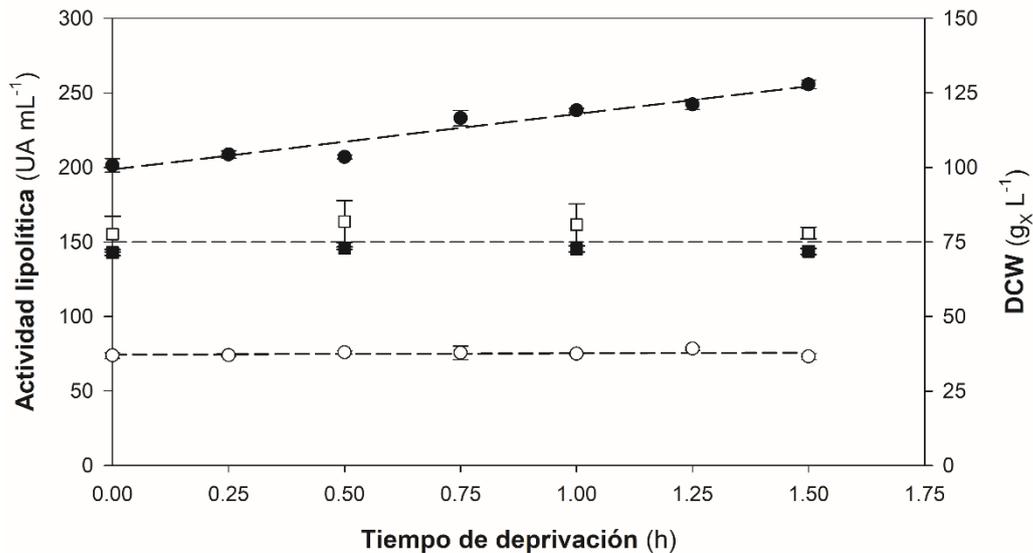


Fig 5.1. Variación de la actividad lipolítica y peso seco (DCW) durante la aplicación de la restricción por carbono a través de la estrategia de *carbon-starving* con los clones SCC (símbolos blancos) y MCC (símbolos oscuros) a una $\mu=0.15 \text{ h}^{-1}$. (●,○) Actividad lipolítica; (■,□) Peso seco. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (*SD*) obtenida en las réplicas técnicas por triplicado.

Durante todo el periodo de restricción de la fuente de carbono, la medida de peso seco (DCW) se mantuvo constante, lo cual se puede considerar como un buen indicador de que, a pesar del periodo de restricción calórica, no se desencadenaron procesos de lisis celular. Previos estudios realizados con *S. cerevisiae* sustentan estos resultados al mostrar

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

que las levaduras pueden soportar largos periodos de ausencia de fuente de carbono sin llegar a perder concentración celular (Boender *et al.*, 2011). Además, se ha observado que genes involucrados con las rutas de señalización TOR (*target of rapamycin*) son inducidos durante periodos de carencia de nutrientes esenciales (carbono, nitrógeno y fósforo), los cuales producen efectos inhibitorios en procesos de autofagia como modo de supervivencia durante estas condiciones (Herman, 2002). Por lo tanto, basándose en estas observaciones es posible llevar a cabo la implementación de esta estrategia de operación durante la expresión de proteínas recombinantes. Sin embargo, análisis complementarios como estudios de viabilidad y especies de oxígeno reactivo (ROS) podrían permitir monitorizar con mayor detalle el efecto directo sobre el estado fisiológico celular, tal como se ha descrito para casos de estrés celular producido por limitación de oxígeno (García-Ortega *et al.*, 2017).

En relación con la formación de producto, el uso de la restricción de la fuente de carbono reflejó un efecto positivo lineal con el tiempo sobre la actividad lipolítica en el caso del MCC, con un incremento de la actividad de ~ 200 UA mL⁻¹ a ~ 255 UA mL⁻¹ (+27% de mejora) (Fig. 5.1). Los valores de actividad observados en cada punto de muestreo durante la ausencia de fuente de carbono revelaron que el aumento de actividad va incrementándose en pequeños escalones de $\sim 4\%$ entre cada punto hasta llegar a un +27% a los 90 minutos (6 puntos de muestreo).

En estudios previos también se mostró un efecto positivo del uso de este tipo de estrés celular sobre la producción de diferentes proteínas recombinantes en microorganismos como *Talaromyces amestolkiae* (Méndez-Líter *et al.*, 2018) y concretamente en levaduras como *Hansenula polymorpha* (Heo *et al.*, 2008) y *P. pastoris* (García-Ortega *et al.*, 2016). Concretamente, en *P. pastoris*, Kern *et al.* (2007) observaron que, durante la ausencia de fuente de carbono, hay una expresión remanente de la proteína recombinante expresada bajo la regulación constitutiva del promotor. Adicionalmente, estudios realizados en *S. cerevisiae* refuerzan la idea que, durante condiciones de estrés por ausencia de fuente de carbono, existe una actividad metabólica muy reducida y no nula (Boender *et al.*, 2011). Lo cual sugiere que puede haber una expresión basal de genes como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (fuente del promotor *GAP*) implicada en la ruta central del metabolismo de carbono y como consecuencia permitiría la expresión basal también de *CRLI*.

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

Mientras el MCC mostró un efecto positivo, por el contrario, en el SCC no se observó variación significativa en la actividad enzimática. Lo cual sería debido a que el SCC cuenta con una copia del *cassette* de expresión en el genoma, de modo que los niveles de expresión de *CRLI* se verían muy reducidos en comparación al MCC que cuenta con una mayor dosis génica (5 copias) tal como se observó en el capítulo anterior en los cultivos en quimiostato a $\mu = 0.15 \text{ h}^{-1}$, donde hubo una reducción de 3 veces en la q_P entre el MCC y el SCC (Fig. 4.2), por lo que, a semejanza, se podría esperar del mismo modo una reducción en la misma magnitud de la expresión basal del *CRLI*, bajando de un 4% de incremento observado a aproximadamente un 1%. Este valor de incremento tan reducido podría encontrarse fuera del nivel de precisión del análisis de actividad utilizado, el cual no permitiría ver diferencias tan bajas y, por lo tanto, generar confusión en el momento de considerar despreciable una mejora en la producción de CrI1 que, sin embargo, se podría estar dando, pero en proporciones muy pequeñas.

Para dar mayor soporte y complementar las observaciones previamente descritas, se realizó la secuenciación del transcriptoma (*RNA sequencing*, RNAseq) mediante el uso de la plataforma de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) de Illumina (San Diego, CA, USA). Dicho análisis fue llevado a cabo con el clon de mayor incremento de actividad (MCC) para de esa forma tener una idea más clara de los posibles eventos fisiológicos desencadenados debido al uso de esta estrategia de operación. La interpretación de los datos se realizó en colaboración con el Prof. Anton Glieder de la Graz University of Technology (TUGraz) y CEO de la empresa Biology for Synthesis (Bisy GmbH, Graz, Austria).

5.2.1.2 Análisis transcripcional RNAseq

Para tener una visión general de los diferentes eventos producidos en el metabolismo celular se hizo la secuenciación del transcriptoma de una muestra representativa, que se obtuvo a la mitad de la aplicación de la restricción por fuente de carbono, es decir a los 45 min. Ésta a su vez se comparó con la muestra obtenida al alcanzar el estado estacionario antes de la parada en las bombas de caudal de adición y salida.

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

En la Fig. 5.2 se representa de forma general la regulación observada en los diferentes transcritos detectados durante la secuenciación (datos no mostrados). Esta aproximación general permitió detectar a grandes rasgos que un 66% de los transcritos detectados mostraron una regulación negativa (*down-regulation*) con valores de $\log_2 \text{fold change}$ (LFC) negativos en comparación al total de genes detectados; es decir, aproximadamente sólo 1/3 de los transcritos mostraron una regulación positiva, lo cual cobra sentido de acuerdo al hecho de que muchos procesos metabólicos son reprimidos durante la aplicación de este tipo de estrés (Bisschops *et al.*, 2017). Sin embargo, cabe prestar atención en casos particulares para elucidar detalles de los procesos involucrados con la ausencia de fuente de carbono.

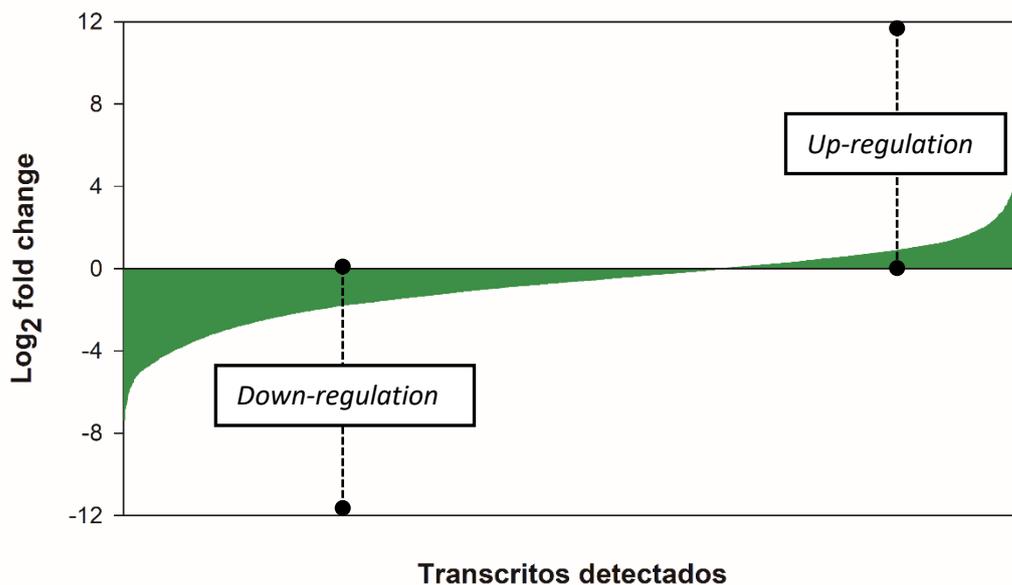


Fig 5.2. Visión global de la regulación en los diferentes transcritos observada a los 45 min de aplicada la restricción de fuente de carbono (*carbon-starving*) una vez alcanzado el estado estacionario en un quimiostato a $\mu=0.15 \text{ h}^{-1}$.

En referencia a la expresión de genes específicos, al ser la primera vez que se trabaja con este tipo de datos en el grupo de investigación, se realizó la búsqueda y el análisis de la regulación de ciertos genes de interés en base a la bibliografía relacionada (Tabla 5.1). Este conjunto de genes seleccionados está relacionado con el transporte y asimilación de glucosa, la síntesis de CrI1 y la respuesta a proteínas mal plegadas (*unfolded protein response*, UPR).

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

Tabla 5.1. Resumen de principales genes regulados a los 45 min de aplicada la restricción de fuente de carbono (*carbon-starving*) después de alcanzar el estado estacionario en un quimiostato a $\mu=0.15h^{-1}$.

Nombre del Gen	Descripción del gen	LFC
<i>TDH3</i>	Glicerlardehído-3-fosfato deshidrogenasa	-0.13
<i>GTH2</i>	Transportador de glucosa de alta afinidad 2	+4.41
<i>CRL1</i>	Lipasa 1 de <i>C. rugosa</i>	+0.92
<i>KAR2</i>	Chaperona del UPR	+0.21
<i>PDI</i>	Proteína disulfuro-isomerasa	-0.97

Por otra parte, con relación a la expresión de los genes codificantes de los transportadores de glucosa (responsables de incorporar el sustrato al medio intracelular), en la actualidad se han descrito 2 transportadores de alta afinidad (*GTH1* y *GTH2*), fuertemente relacionados con el efecto *Crabtree* negativo de *P. pastoris* (Rebnegger *et al.*, 2016). De este modo, la regulación observada para estos genes ha mostrado estar de acuerdo con los resultados presentados en el trabajo de Rebnegger *et al.* (2016), en el que se describe una sobreexpresión de *GTH2* y una represión de *GTH1* (datos no mostrados) para cultivos en condiciones de velocidad específica de crecimiento cercanas a cero (retentostato). Estos efectos son muy parecidos y contrastables con los observados en el presente trabajo mediante la aplicación de *carbon-starving*. La regulación observada en *GTH2* (+4.41 LFC) junto a la expresión remanente de *TDH3* evidencia la adaptación metabólica de *P. pastoris* antes estas condiciones de estrés. Este acondicionamiento del estado celular implicaría por lo tanto la preservación de la capacidad de consumo de glucosa frente un eventual retorno de la fuente de carbono tal como propone Garcia-Ortega *et al.* (2016) en la aplicación de la restricción de carbono en la producción de un fragmento del anticuerpo Fab 2F5.

Con relación a la regulación del grupo de genes que intervienen en la síntesis de proteínas, en concordancia con lo descrito por Burgard *et al.* (2017), un gran número de genes propios de la biogénesis del ribosoma (*ribosomal proteins*), en concreto las que forman parte de las subunidades ribosómicas (60S, 40S), se hallaron fuertemente reprimidos (llegando a niveles de -6.97 LFC= 0.80 %). Por lo tanto, la represión detectada en este grupo de genes otorga sentido a que a pesar de haber una expresión de los genes

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

governados por el promotor *GAP* (*TDH3* -0.13 LFC= 90 % y *CRL1* +0.92 LFC=189 %), esto no se traduce con la misma intensidad en un incremento de la actividad enzimática, sino que está limitada a pequeños incrementos de ~4% por cada punto de muestreo.

Finalmente, para proteínas involucradas en la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (*unfolded protein response*, UPR), se observó que la chaperona Kar2p, involucrada en la ruta de secreción (Puxbaum *et al.*, 2015), mostró una ligera regulación de +15% (+0.21 LFC= 115%). Sin embargo, para el caso de una proteína miembro de la familia de la proteína disulfuro-isomerasa (Pdi), se mostró una ligera tendencia a la baja en los niveles de expresión (-0.97 LFC= 50%).

El uso de una herramienta como la secuenciación masiva del transcriptoma (RNAseq) permitió dar luz sobre los procesos intracelulares desencadenados por la aplicación del *carbon-starving*. Sin embargo, la poca disponibilidad de anotaciones robustas (*data curation*), genera uno de los mayores retos en el momento de analizar y contrastar la información obtenida con diferentes bases de datos (Sturmberger *et al.*, 2016). Por otra parte, la realización de estudios comparativos más profundos a diferentes tiempos de estrés por restricción de carbono, los cuales incluyan la implementación de réplicas, permitirá dar mayor soporte y tener un conocimiento más detallado de los procesos desencadenados por la aplicación de este tipo de estrés.

5.2.2 Implementación de la restricción por fuente de carbono (*carbon-starving*) en cultivos en *fed-batch*

Una vez realizada la caracterización fisiológica del efecto de la aplicación del estrés producido por la aplicación del *carbon-starving* en cultivos en quimiostato, se decidió realizar la implementación de esta estrategia en modo de operación *fed-batch*, el cual es considerado como el más aplicado a nivel industrial (Birol *et al.*, 2002; Bodizs *et al.*, 2007). La estrategia de alimentación se basó en un perfil de adición exponencial preprogramado (en condiciones de carbono limitante) a una $\mu = 0.15 \text{ h}^{-1}$; durante la cual se incluyeron periodos de paradas del caudal de alimentación de 30 min cada 90 min, tal como fue descrito por Garcia-Ortega *et al.* (2016) como la mejor condición de entre varias combinaciones en la producción de un fragmento de anticuerpo. Los cultivos se realizaron tanto con el SCC y el MCC, y fueron comparados respectivamente con cultivos en

5. Aplicación de la deprivación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

condiciones de alimentación estándar, utilizando la misma cantidad de sustrato total añadido a tiempo final en ambos casos.

En la Fig. 5.3 se representa el curso de la actividad lipolítica total durante la fase de alimentación (*feeding*), bajo el efecto del *carbon-starving* y en condiciones estándar de alimentación tanto con el SCC (Fig. 5.3A) como con el MCC (Fig.5.3B). Tal como fue descrito en el capítulo anterior, la diferencia observada en la actividad enzimática entre los diferentes clones se atribuye principalmente al efecto producido por la dosis génica (*gene dosage*) presente en cada clon que hace que el MCC sea capaz de producir CrI1 en mayores proporciones que el SCC. Sin embargo, la presente discusión está enfocada en mayor medida a determinar el efecto e implicaciones que conlleva el uso de este tipo de estrés fisiológico sobre los diferentes parámetros de eficiencia del bioproceso en cada uno de los clones.

Para el caso del SCC, se observa que, bajo periodos cortos de ausencia de fuente de carbono, la actividad enzimática de CrI1 (*titer*) fue menor (-34%) en comparación a la obtenida bajo un perfil estándar de adición, llegándose a observar una disminución en todos los parámetros de bioproceso relacionados con la producción de CrI1 (Tabla 5.2). Si bien, en los estudios realizados en quimiostato no mostraron cambios notables en la actividad para este clon, durante el cambio de modo de operación a *fed-batch* se detecta un cambio en el patrón de comportamiento relacionado a la formación de producto. Una posible hipótesis para justificar estos resultados estaría relacionada con el hecho de que al trabajar a mayores concentraciones de biomasa, se pueden generar limitaciones en la transferencia de materia. La cual sumada con la restricción de fuente de carbono desencadenan una condición de estrés metabólico. Así, puede conllevar a una serie de cambios que permitan el mantenimiento celular bajo estas condiciones de estrés fisiológico. Por lo tanto, a pesar de haber una transcripción basal del gen *CRLI* y considerando que los niveles de transcritos ya de por sí son bajos por ser el caso SCC, el procesamiento postranscripcional de los respectivos mRNA podría verse afectado por las limitaciones generadas en la aplicación del *carbon-starving* sobre la maquinaria implicada en la síntesis y secreción de proteínas en este clon tal como se observó en el análisis transcripcional. Así, a pesar de tener una expresión remanente del gen de interés, no compensaría las limitaciones derivadas del uso del de operación en *fed-batch* durante la expresión de *CRLI*.

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

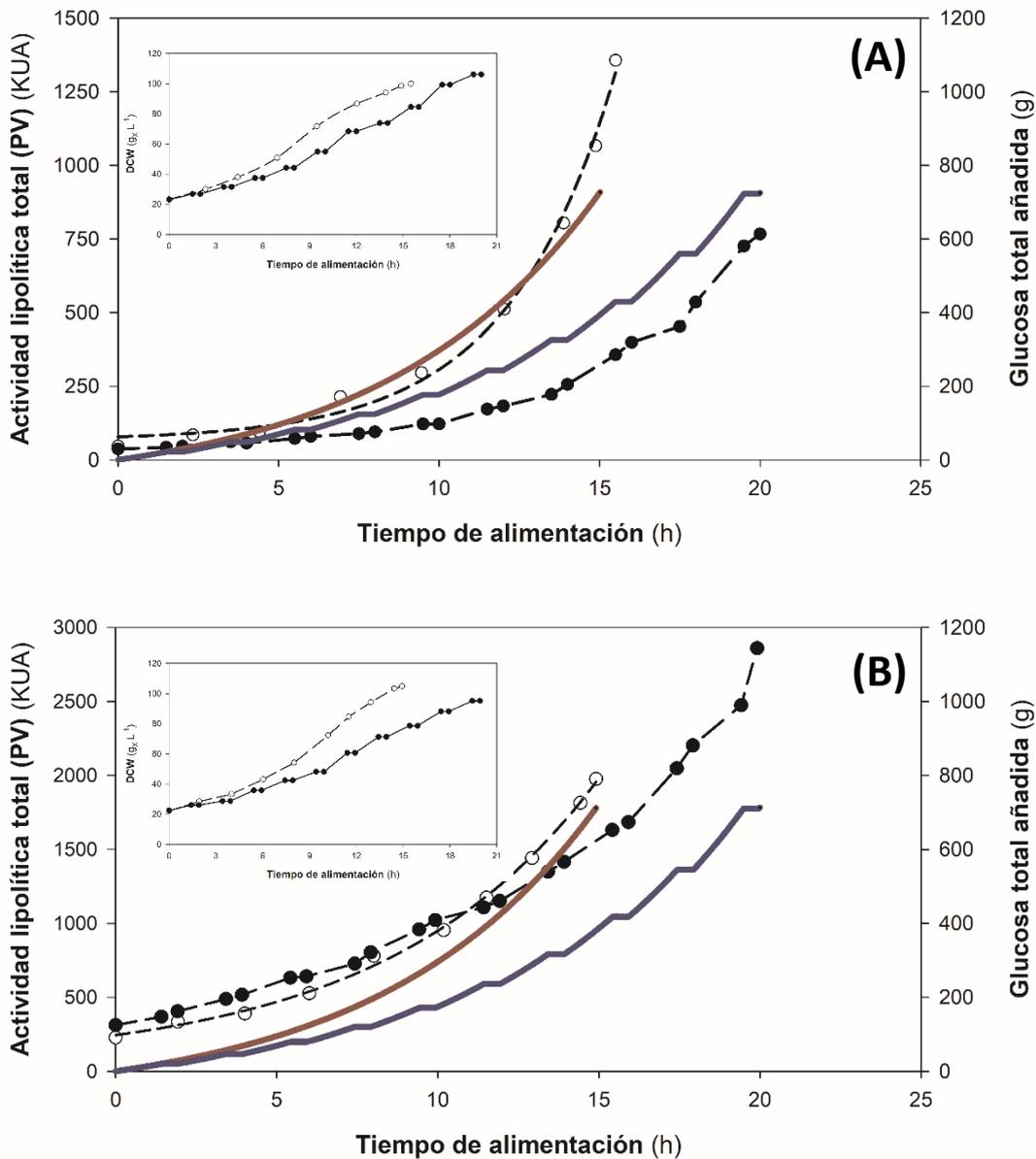


Fig. 5.3. Variación de la actividad lipolítica total en cultivos en modo de operación en *fed-batch* utilizando los clones *single-copy* (SCC) (A) y *multi-copy* (MCC) (B) a una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.15 h^{-1} bajo perfiles de adición estándar (○) y *carbon-starving* (30 min de parada por 90 min de alimentación) (●). Las líneas continuas roja (SCC) y azul (MCC) corresponden a la cantidad de glucosa total añadida durante el tiempo de alimentación. La variación del peso seco (DCW) para cada cultivo se encuentra incluida dentro de cada gráfico utilizando los mismos símbolos para cada perfil de alimentación.

En cambio, para los cultivos realizados con el MCC, a diferencia del clon anterior, este exhibe un incremento en la actividad total de un +45% (Tabla 5.2), lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización en quimiostato donde a los 30 min de aplicada el *carbon-starving* se observó un incremento de +9%. Aunque el efecto observado en ambos modos de operación sugiere mejoras en la formación de producto,

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

es notorio un mayor incremento durante la operación en *fed-batch* lo cual se refuerza al observar los incrementos en los rendimientos del producto respecto de la biomasa ($Y_{P/X}$) y al sustrato ($Y_{P/S}$) de +53% y +45% respectivamente en comparación a las condiciones estándar de alimentación (Tabla 5.2).

La aplicación de no sólo uno, sino varios ciclos de parada de la alimentación durante toda la fermentación (10 ciclos) sugieren un posible efecto aditivo sobre esta estrategia en la producción de CrI1. Cabe resaltar que durante la aplicación de los primeros ciclos de *carbon-starving* no es detectable un incremento sustancial de la formación de producto, debido posiblemente a los bajos niveles de expresión de *CRLI* que hace que los cambios no sean significativos durante los primeros estadios, o a una falta de precisión en el ensayo de actividad. Sin embargo, es en los últimos ciclos donde se observa cambios notables en la actividad enzimática. Si bien este hecho puede estar asociado a la mayor concentración de biomasa presente en los últimos ciclos, también puede estar asociado a que la expresión de *CRLI* va ligada como un efecto colateral de un proceso de adaptación acumulativa al estrés celular producido por el *carbon-starving*. El someter a las células a constantes ciclos de privación y suministro de la fuente de carbono podría generar una predisposición cada vez mayor del metabolismo celular frente a cada ciclo de *starving* a través de un posible mecanismo de adaptación. Así, con cada ciclo de *starving*, la actividad basal de aquellas enzimas involucradas en el consumo de fuente de carbono se vería incrementada frente a un inminente retorno de la alimentación y como consecuencia, aumentando la expresión de la proteína recombinante al estar gobernada por un promotor constitutivo (*GAP*). Además, debe sumarse el efecto positivo de la dosis génica en el MCC que magnifica aún más la expresión basal de *CRLI*, lo que al final permite obtener mejoras significativas durante la implementación del *carbon-starving* en comparación al SCC. Finalmente, en el momento de interpretar los valores relacionados con las productividades tanto volumétrica (Q_P) como específica (Q_e), se observa que, aunque muestran tendencias positivas, éstas se encuentran en mucho menor proporción (+3% y +14% respectivamente) que las observadas en los rendimientos y valores de actividad en el MCC (superiores al 40%). Aunque puede llevar a confusiones, si se tiene en cuenta que dichos parámetros de bioproceso dependen del tiempo de alimentación total, adquiere sentido que para el caso de los cultivos bajo *carbon-starving* donde el tiempo de fermentación es mayor por el efecto de las paradas influya en la determinación de dichos parámetros.

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

Tabla 5.2. Principales parámetros de producción obtenidos con los clones mono copia (SCC) y multicopia (MCC) de *CRL1* en cultivos en *fed-batch* a una μ de 0.15 h⁻¹ bajo un perfil de adición estándar y con la implementación de la privación de fuente de carbono. Para la comparación de filas se utilizó los valores obtenidos en condiciones estándar como referencia en cada clon.

Perfil de alimentación	Clon de copia única (SCC)		Clon multicopia (MCC)	
	<i>Estándar</i>	<i>Carbon-starving</i>	<i>Estándar</i>	<i>Carbon-starving</i>
μ Nominal (h ⁻¹)	0.15	0.15	0.15	0.15
Actividad Crl1 (UA mL ⁻¹)	325	215	583	802
Incremento de la actividad Crl1 (%)	-	-34%	-	+37%
<i>PV</i> (10 ⁵ UA)	10.9	7.20	17.4	25.3
Incremento de <i>PV</i> (%)	-	-34%	-	+45%
Q_p (10 ³ UA L ⁻¹ h ⁻¹)	20.7	10.1	34.4	35.5
Incremento de la Q_p (%)	-	-51%	-	+3%
Q_e (UA h ⁻¹ g _x ⁻¹)	207	95.0	328	373
Incremento de la Q_e (%)	-	-54%	-	+14%
$Y_{P/S}$ (10 ³ UA g _s ⁻¹)	1.50	0.99	2.45	3.55
Incremento del $Y_{P/S}$ (%)	-	-34%	-	45%
$Y_{P/X}$ (10 ³ UA g _x ⁻¹)	3.58	2.17	5.60	8.60
Incremento del $Y_{P/X}$ (%)	-	-40%	-	+53%

† μ , velocidad específica de crecimiento; *PV*, actividad total; Q_p , productividad volumétrica; Q_e , productividad específica; $Y_{P/S}$, rendimiento global del producto respecto del sustrato; $Y_{P/X}$, rendimiento global del producto respecto de la biomasa. **Los parámetros de producción se calcularon a tiempo final durante el periodo de alimentación.**

5. Aplicación de la deprivación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

Finalmente, se puede concluir que para la implementación del estrés mediado por la aplicación del *carbon-starving* como estrategia de mejora del bioproceso es importante determinar las características intrínsecas de cada clon que condicionarán una mejora o no durante la aplicación de esta estrategia. En el presente estudio se demostró que el efecto desencadenado con la aplicación de condiciones de estrés basadas en el *carbon-starving* genera diferentes respuestas en cada uno los clones utilizados, mostrándose como una estrategia que ofrece resultados positivos para el MCC por las ventajas que supone al obtener mayor cantidad de producto con la misma cantidad de sustrato lo cual se demuestra en las diferentes variables del bioproceso relacionadas con la formación de CrI1.

En relación con el uso de la secuenciación de transcriptoma (RNAseq), a pesar de que se obtuvo información valiosa durante su análisis, es importante decir que es la primera vez que se manejan este tipo de datos y que existen una serie de herramientas bioinformáticas que permitirían obtener más información. Sin embargo, aún no se cuenta con la suficiente experiencia en el uso de dichas herramientas, además que se necesitaría el uso de réplicas biológicas para el cálculo de los estadísticos necesarios para muchos de estos análisis. Por lo que se abre camino a futuros análisis que permitan entender a fondo las bases fisiológicas del *carbon-starving* lo cual permitirá no solo realizar mejoras desde el ámbito del bioproceso sino también a través de la modificación genética con el objetivo obtener clones que se adapten de mejor forma a estas condiciones y sean mucho más competitivos.

Adicionalmente, el uso de análisis complementarios como la expresión de proteínas reporteras como GFP podría ser útil al momento de determinar la posible presencia de cuellos de botella en el MCC que puedan generar una acumulación de producto el cual es liberado durante la aplicación del *carbon-starving*, para de esa manera determinar si el aumento en la actividad es debido a la secreción de la proteína acumulada intracelularmente en el MCC o a un aumento real en la síntesis de la misma.

Este conocimiento permitirá afinar la generación de nuevas estrategias de bioproceso basadas en el *carbon-starving* mediante el diseño racional, las cuales sean de gran utilidad para su posible implementación industrial al determinar las condiciones óptimas de producción.

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

5.3 Referencias

- Barriuso, J., Vaquero, M.E., Prieto, A., and Martínez, M.J. (2016) Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. *Biotechnol Adv* **34**: 874–885.
- Baumann, K., Maurer, M., Dragosits, M., Cos, O., Ferrer, P., and Mattanovich, D. (2008) Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng* **100**: 177–183.
- Birol, G., Ündey, C., and Çinar, A. (2002) A modular simulation package for fed-batch fermentation: penicillin production. *Comput Chem Eng* **26**: 1553–1565.
- Bisschops, M.M.M., Luttk, M.A.H., Doerr, A., Verheijen, P.J.T., Bruggeman, F., Pronk, J.T., and Daran-Lapujade, P. (2017) Extreme calorie restriction in yeast retentostats induces uniform non-quiescent growth arrest. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1864**: 231–242.
- Bodizs, L., Titica, M., Faria, N., Srinivasan, B., Dochain, D., and Bonvin, D. (2007) Oxygen control for an industrial pilot-scale fed-batch filamentous fungal fermentation. *J Process Control* **17**: 595–606.
- Boender, L.G.M., Almering, M.J.H., Dijk, M., van Maris, A.J.A., de Winde, J.H., Pronk, J.T., and Daran-Lapujade, P. (2011) Extreme calorie restriction and energy source starvation in *Saccharomyces cerevisiae* represent distinct physiological states. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1813**: 2133–2144.
- Burgard, J., Valli, M., Graf, A.B., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2017) Biomarkers allow detection of nutrient limitations and respective supplementation for elimination in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Microb Cell Fact* **16**: 117.
- Chang, S.W., Lee, G.-C., and Shaw, J.-F. (2006) Codon optimization of *Candida rugosa* lip1 gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *J Agric Food Chem* **54**: 815–822.
- Dragosits, M., Frascotti, G., Bernard-Granger, L., Vázquez, F., Giuliani, M., Baumann, K., *et al.* (2011) Influence of growth temperature on the production of antibody Fab fragments in different microbes: A host comparative analysis. *Biotechnol Prog* **27**: 38–46.
- Dragosits, M., Graf, A., Gasser, B., Mattanovich, D., Stadlmann, J., Altmann, F., *et al.* (2010) The response to unfolded protein is involved in osmotolerance of *Pichia pastoris*. *BMC Genomics* **11**: 207.
- Dragosits, M., Stadlmann, J., Albiol, J., Baumann, K., Maurer, M., Gasser, B., *et al.* (2009) The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *J Proteome Res* **8**: 1380–1392.
- Ercan, O., Bisschops, M.M.M., Overkamp, W., Jørgensen, T.R., Ram, A.F., Smid, E.J., *et al.* (2015) Physiological and transcriptional responses of different industrial microbes at near-zero specific growth rates. *Appl Environ Microbiol* **81**: 5662–70.
- García-Ortega, X., Adelantado, N., Ferrer, P., Montesinos, J.L., and Valero, F. (2016) A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*: From

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*
- specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. *Process Biochem* **51**: 681–691.
- García-Ortega, X., Cámara, E., Ferrer, P., Albiol, J., Montesinos-Seguí, J.L., and Valero, F. (2019) Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol free GAP promoter. Where do we stand? *N Biotechnol* **53**: 24–34.
- García-Ortega, X., Valero, F., and Montesinos-Seguí, J.L. (2017) Physiological state as transferable operating criterion to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris* through oxygen limitation. *J Chem Technol Biotechnol* **92**: 2573–2582.
- Gasser, B. and Mattanovich, D. (2018) A yeast for all seasons – Is *Pichia pastoris* a suitable chassis organism for future bioproduction? *FEMS Microbiol Lett* **365**: 181.
- Gasser, B., Prielhofer, R., Marx, H., Maurer, M., Nocon, J., Steiger, M., *et al.* (2013) *Pichia pastoris*: Protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiol* **8**: 191–208.
- Hao, Y., Zheng, X., Zhang, X., Zhang, K., Lin, Y., and Liang, S. (2019) Combined strategies for engineering a novel whole-cell biocatalyst of *Candida rugosa* lipase with improved characteristics. *Biochem Eng J* **151**: 107337.
- Heo, J.H., Ananin, V., Kang, H.A., Rhee, S.K., and Kim, C.H. (2008) Feeding strategies for the enhanced production of recombinant human serum albumin in the fed-batch cultivation of *Hansenula polymorpha*. *Process Biochem* **43**: 918–924.
- Herman, P.K. (2002) Stationary phase in yeast. *Curr Opin Microbiol* **5**: 602–607.
- Huang, M., Bao, J., and Nielsen, J. (2014) Biopharmaceutical protein production by *Saccharomyces cerevisiae*: current state and future prospects. *Pharm Bioprocess* **2**: 167–182.
- Kern, A., Hartner, F.S., Freigassner, M., Spielhofer, J., Rumpf, C., Leitner, L., *et al.* (2007) *Pichia pastoris* “just in time” alternative respiration. *Microbiology* **153**: 1250–1260.
- Kuo, T.C., Shaw, J.F., and Lee, G.C. (2015) Improvement in the secretory expression of recombinant *Candida rugosa* lipase in *Pichia pastoris*. *Process Biochem* **50**: 2137–2143.
- Li, X., Liu, Z., Wang, G., Pan, D., Jiao, L., and Yan, Y. (2016) Overexpression of *Candida rugosa* lipase Lip1 via combined strategies in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* **82**: 115–124.
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., *et al.* (2015) Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv* **33**: 1177–1193.
- Méndez-Líter, J.A., De Eugenio, L.I., Prieto, A., and Martínez, M.J. (2018) The β -glucosidase secreted by *Talaromyces amestolkiae* under carbon starvation: A versatile catalyst for biofuel production from plant and algal biomass. *Biotechnol Biofuels* **11**: 123.
- Nocon, J., Steiger, M.G., Pfeffer, M., Sohn, S.B., Kim, T.Y., Maurer, M., *et al.* (2014) Model based engineering of *Pichia pastoris* central metabolism enhances recombinant protein production. *Metab Eng* **24**: 129–138.

5. Aplicación de la privación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

- Peña, D.A., Gasser, B., Zanghellini, J., Steiger, M.G., and Mattanovich, D. (2018) Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metab Eng* **50**: 2–15.
- Porro, D., Gasser, B., Fossati, T., Maurer, M., Branduardi, P., Sauer, M., and Mattanovich, D. (2011) Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**: 939–948.
- Puxbaum, V., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2015) Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 2925–2938.
- Rebnegger, C., Vos, T., Graf, A.B., Valli, M., Pronk, J.T., Daran-Lapujade, P., and Mattanovich, D. (2016) *Pichia pastoris* exhibits high viability and a low maintenance energy requirement at near-zero specific growth rates. *Appl Environ Microbiol* **82**: 4570–4583.
- Sanchez-Garcia, L., Martín, L., Manges, R., Ferrer-Miralles, N., Vázquez, E., and Villaverde, A. (2016) Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update. *Microb Cell Fact* **15**: 33.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., and Mehta, P.K. (2017) Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech* **7**: 15.
- Sturmberger, L., Chappell, T., Geier, M., Krainer, F., Day, K.J., Vide, U., *et al.* (2016) Refined *Pichia pastoris* reference genome sequence. *J Biotechnol* **235**: 121–131.
- Vieira Gomes, A., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F., and Parachin, N. (2018) Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. *Microorganisms* **6**: 38.
- Vogl, T. and Glieder, A. (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *N Biotechnol* **30**: 385–404.
- Weninger, A., Fischer, J.E., Raschmanová, H., Kniely, C., Vogl, T., and Glieder, A. (2018) Expanding the CRISPR/Cas9 toolkit for *Pichia pastoris* with efficient donor integration and alternative resistance markers. *J Cell Biochem* **119**: 3183–3198.

5. Aplicación de la deprivación de la fuente de carbono (*carbon-starving*) como una estrategia novedosa de bioproceso en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

6 Comparación de los promotores *GAP* y *AOX1* durante la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

6.1 Introducción

El creciente uso de la levadura no convencional *P. pastoris* (*Komagataella phaffii*) en la producción de proteínas recombinantes (RPP) así como de metabolitos, la ha posicionado como una emergente factoría celular alternativa a microorganismos convencionales como la bacteria *Escherichia coli* o la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Cereghino and Cregg, 2000; Peña *et al.*, 2018; Fischer and Glieder, 2019). El potencial de *P. pastoris* como hospedero versátil y eficiente para la RPP recae básicamente en su capacidad de crecimiento a altas densidades celulares en medios definidos, además de poder realizar modificaciones postraduccionales y secretar los productos de interés al medio extracelular, siendo muy baja la concentración de proteínas endógenas (Daly and Hearn, 2005; Burgard *et al.*, 2019; García-Ortega *et al.*, 2019). El conocimiento disponible relacionado con las bases moleculares implicadas en los procesos de expresión, síntesis y secreción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* basados en la ingeniería de promotores, de péptidos señal y herramientas de edición del genoma entre otros, ha permitido desarrollar diversas estrategias que han hecho posible obtener grandes logros en el incremento de la eficiencia sobre la producción de diversas proteínas de interés (Guerfal *et al.*, 2010; Barrero *et al.*, 2018; Roth *et al.*, 2018; Weninger *et al.*, 2018; Ergün *et al.*, 2019). En particular, el proceso de transcripción es habitualmente considerado como una fase crítica, la cual es altamente dependiente de la regulación ejercida por los promotores los cuales se encargan de activar dicho proceso. Dichos elementos cuentan con diferentes tipos de regulación, que pueden ser del tipo inducible, desreprimible o constitutiva (Vogl and Glieder, 2013; Kang *et al.*, 2017).

El interés generado sobre el estudio de las enzimas responsables de la capacidad metilotrófica de *P. pastoris*, es decir, de su capacidad para metabolizar metanol, permitió la caracterización de las enzimas responsables del primer paso de oxidación de este substrato, la alcohol oxidasa 1 y 2 (*AOX1* y *AOX2*) (Cregg *et al.*, 1989). Los estudios relacionados con los elementos implicados en la regulación de la expresión de las mismas, permitió identificar al promotor inducible del gen *AOX1* (P_{AOX1}), el cual ha destacado por ser un promotor fuerte (llegando ser responsable del 30 % de la proteína total de las células) y de estricta regulación (Gasser *et al.*, 2013; Vogl and Glieder, 2013). En términos de su regulación, este promotor es fuertemente inducido por la presencia de metanol, mientras que es reprimido en presencia de glucosa y en menor medida, por

glicerol (Potvin *et al.*, 2012; Gidijala *et al.*, 2018). No obstante, en ausencia de sustrato se ha observado una ligera desrepresión (2-4 %) (Vogl and Glieder, 2013). Dichas características han permitido que en el diseño de bioprocesos haciendo uso de clones recombinantes de *P. pastoris* bajo el control del P_{AOXI} , se pueda desacoplar la fase de crecimiento celular de la de inducción, generando, en consecuencia, un mayor control de la síntesis proteica (Liu *et al.*, 2019).

En conjunto, las características previamente descritas han permitido extender la aplicación del P_{AOXI} de manera exitosa a la expresión de diferentes proteínas heterólogas y/o haciendo uso de diferentes estrategias de bioproceso (Cos *et al.*, 2005; Jungo *et al.*, 2007; Barrigón *et al.*, 2013; Ponte *et al.*, 2016). Sin embargo, a pesar de las ventajas ofrecidas por el uso de dicho promotor, el uso de metanol conlleva desventajas como: i) Dificultad en el monitoreo *on-line* de la concentración de metanol en el medio, ii) El metanol es un sustrato altamente inflamable, que genera importantes requerimientos de seguridad tanto en su manipulación como en su almacenamiento, lo cual implica mayores costes en la adaptación de dichas medidas, iii) El consumo de metanol implica desventajas como la generación de calor, altas demandas de oxígeno (Prielhofer *et al.*, 2013; Valero and López-Santín, 2017; Veloso and Ferreira, 2017; Juturu and Wu, 2018), además de la formación de subproductos, pudiendo incluso desencadenar procesos de proteólisis y lisis celular (García-Ortega *et al.*, 2019). Frente a esta situación, la búsqueda de promotores alternativos como el promotor *GAP*, propio del gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*TDH3*), una enzima implicada en el proceso de la glicólisis, ha sido descrita como una alternativa por su patrón de expresión constitutivo (Ata *et al.*, 2017). Además de solucionar los problemas derivados del uso de metanol debido a no ser dependiente de dicho sustrato, su regulación, al estar acoplada normalmente al crecimiento celular, se muestra como una ventaja para el caso de proteínas recombinantes que no presenten efectos tóxicos sobre las células ya que permite que el rendimiento de la proteína expresada sea proporcional a la masa celular (Çalik *et al.*, 2015). A continuación se citan diversos trabajos que han tenido como objetivo la caracterización y optimización del uso del promotor *GAP* a través de novedosas estrategias de operación aplicadas a este bioproceso (García-Ortega *et al.*, 2013, 2016, 2017; Zhu *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2016; Adelantado *et al.*, 2017; García-Ortega *et al.*, 2019).

La selección de un determinado promotor para la producción de una proteína recombinante está determinada tanto por las características intrínsecas de la proteína de

interés como por los requerimientos de la estrategia de bioproceso a utilizar durante su implementación (Looser *et al.*, 2015). Así, en la bibliografía se puede observar una serie de estudios comparativos, los cuales demuestran que para unos casos particulares los mejores resultados se obtienen al utilizar el P_{AOXI} mientras que en otros, se muestra al P_{GAP} como mejor alternativa con relación a la producción de proteínas recombinantes (Hohenblum *et al.*, 2004; Menéndez *et al.*, 2004; Delroisse *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009). Por consiguiente, se requieren estudios adicionales que permitan conocer en detalle qué factores afectan la eficiencia en términos de expresión de proteínas heterólogas para cada promotor (P_{GAP} y P_{AOXI}), ya que parece estar fuertemente influenciada por la proteína recombinante expresada.

Frente a esta situación se hace necesario analizar el comportamiento de cada sistema en particular, con el fin de desarrollar sistemas de producción óptimos siguiendo la línea del diseño racional tal como se ha descrito en los capítulos anteriores. Dicho estudio sistematizado podrá extenderse más allá de los promotores *GAP* y *AOXI*, al ser igualmente útil en la comparación y caracterización de sistemas regulados por promotores alternativos (nativos o *ingenierizados*).

Por otra parte, cabe mencionar también que el efecto del número de copias (*gene-dosage*) puede ejercer un efecto determinante sobre los parámetros fisiológicos y de bioproceso. Algunos autores han reportado que el incremento de la dosis génica ejerce un efecto positivo sobre la formación de producto (Nordén *et al.*, 2011; Vogl *et al.*, 2018). Sin embargo, en algunos casos se observa que por encima de un umbral dichos efectos se tornan negativos debido a las limitaciones generadas en la maquinaria celular, tal como se observó en los factores de transcripción involucrados en la expresión de proteínas gobernadas por el promotor *AOXI* (Cámara *et al.*, 2017).

En el presente estudio se llevó a cabo la comparación de 4 clones recombinantes de *P. pastoris* que expresan la lipasa 1 de *Candida rugosa* (Cr11) bajo el control de los promotores *GAP* y *AOXI* haciendo uso de cultivos en continuo (quimiostato). Por cada promotor se utilizaron dos clones con diferentes dosis génicas: uno con la presencia de una sola copia (SCC) del gen de interés, y otro con varias copias integradas en el genoma (MCC). El uso de este modo de operación permitió realizar una caracterización del efecto de la dosis génica en los dos sistemas de regulación estudiados. Los cultivos en quimiostato hicieron posible obtener datos robustos y altamente reproducibles, los cuales han sido utilizados para llevar a cabo una amplia caracterización fisiológica y de la

producción de los diferentes clones a diferentes velocidades específicas de crecimiento (μ).

6.2 Resultados y discusión

6.2.1 Construcción de clones y determinación de la dosis génica

Para realizar la comparativa del efecto del uso de los promotores *GAP* y *AOXI* en la expresión de *CRL1* se utilizaron diferentes clones recombinantes de *P. pastoris*. Por cada promotor fueron seleccionados dos clones con diferente dosis génica, con una sola copia (*single-copy clone*, SCC) y múltiples copias (*multi-copy clone*, MCC) del *cassette* de expresión de *CRL1* respectivamente. Con relación a los clones que utilizaron el P_{GAP} , se utilizaron aquellos descritos en el Capítulo 4 y 5, mientras que, para el caso de aquellos regulados por el P_{AOXI} , se generaron nuevos clones haciendo uso de la misma metodología utilizada para los clones anteriores. Dicho proceso, así como su posterior caracterización, corresponden a una colaboración realizada con el también candidato a Doctor, Javier Garrigós-Martínez, dicho trabajo se ha publicado durante el año 2019 (Garrigós-Martínez *et al.*, 2019). Del mismo modo que en el caso del P_{GAP} , se espera la integración del *cassette* de expresión en el locus del gen *AOXI*, sin embargo, tal como se ha descrito para *P. pastoris*, eventos de recombinación no homóloga o de inserción múltiple pueden generarse en el caso del clon multicopia, lo cual expande el espectro de variabilidad clonal (Schwarzahans *et al.*, 2016b).

Se realizaron análisis de ddPCR (*droplet digital PCR*) para determinar con precisión la dosis génica de los clones utilizados. Éstos revelaron presencia de una y cinco copias del *cassette* de expresión para los clones controlados bajo el P_{GAP} , tal como fue descrito previamente; mientras que se determinaron una y tres copias en aquellos clones regulados bajo el P_{AOXI} .

6.2.2 Comportamiento de los parámetros fisiológicos en la expresión de *CRL1* bajo el gobierno del P_{AOXI} y el P_{GAP}

La expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris* ha mostrado ser altamente dependiente del tipo de promotor utilizado, ya que influye directamente en los niveles de producción, así como en la fisiología celular. Específicamente, el uso de los promotores *GAP* y *AOXI*, al ser los primeros en describirse y estar ampliamente utilizados ha impulsado el interés para llevar a cabo la comparación entre dos sistemas altamente robustos pero que poseen una diferente regulación de su expresión. La metodología aplicada en este estudio comparativo servirá como punto de partida para estudios posteriores en clones recombinantes regulados por diferentes promotores alternativos, ya sean obtenidos mediante el rastreo de promotores nativos o mediante la *ingenierización* de los mismos.

Para la comparación de ambos promotores en la expresión de *Crl1*, se llevaron a cabo cultivos en quimiostato a diferentes velocidades de dilución (D) que permitieron la caracterización de ambos sistemas bajo condiciones de estado estacionario (*steady-state*), lo cual implicó verificar la estabilidad de los parámetros clave estudiados desde como mínimo el tercer tiempo de residencia hasta el quinto. Para el caso del promotor *GAP*, se abarcó un rango de velocidades específicas de crecimiento (μ) que fue de 0.025-0.15 h^{-1} ; mientras que para el promotor *AOXI*, se tuvo que reducir el rango de estudio de 0.02-0.095 h^{-1} para evitar el efecto de lavado que se observó a velocidades más rápidas (datos no mostrados), lo cual es consistente con lo descrito por Looser *et al.* (2017), quien sostiene que la diferencia en el rango operativo de μ durante el uso del P_{AOXI} y el P_{GAP} es debido a la diferente velocidad específica de crecimiento asociada a las diferentes fuentes de carbono utilizadas en la producción de proteínas recombinantes. De este modo, para cultivos con metanol (P_{AOXI}), la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) es menor que la observada con glucosa (P_{GAP}), y por tanto el fenómeno de lavado aparecerá a velocidades de dilución inferiores.

Para la comparativa de ambos promotores, se consideró en primera instancia sólo los clones SCC; de este modo, fue posible analizar únicamente el efecto del uso de los diferentes promotores y evitar posibles sesgos al utilizar clones con diferente dosis génica. Finalmente, los clones MCC se utilizaron para determinar si el efecto observado

6. Comparación de los promotores *GAP* y *AOXI* durante la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

con los clones SCC del P_{GAP} o P_{AOXI} también se extiende o no a clones con diferente número de copias, y valorar la posible influencia del efecto de la dosis génica.

Con relación a las variables de bioproceso utilizadas como indicadores del estado fisiológico (q_S , q_{O_2} , q_{CO_2} y RQ), éstas mostraron diferentes comportamientos durante el uso de cepas que utilizan los promotores *AOXI* y *GAP* (Fig. 6.1). Esto es debido a que se utilizaron diferentes fuentes de carbono según la plataforma de expresión ya que ambos promotores fueron desarrollados a partir de dos rutas metabólicas separadas. Mientras que para el P_{GAP} se utilizó glucosa, ya que dicho promotor proviene del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (una enzima propia de la glicólisis); para el estudio del P_{AOXI} se requirió del uso de metanol, debido a que este promotor se obtuvo a partir del estudio de la regulación de la enzima alcohol oxidasa I, responsable del primer paso de oxidación de dicho sustrato en los peroxisomas.

En ese sentido, cómo era de esperar, las velocidades específicas de consumo específico de oxígeno (q_{O_2}) fueron superiores para ambos clones (SCC y MCC) gobernados por P_{AOXI} , mientras que para las velocidades específicas de producción de dióxido de carbono (q_{CO_2}), mostraron valores similares con los clones regulados por el P_{GAP} (SCC y MCC).

Dicha observación adquiere sentido si se tiene en cuenta las ecuaciones de balance de carbono y redox. Se puede observar que, para el metanol, por cada mol de carbono (*C-mol*), se requiere mayores aportes de oxígeno para ser metabolizarlo en comparación a la glucosa. Sin embargo, aproximadamente la misma proporción de CO_2 es liberada por cada *C-mol* para ambos sustratos. Por otra parte, al calcular los valores de RQ para los cultivos alimentados por metanol se observan valores alrededor de ~ 0.6 , mientras que para aquellos alimentados por glucosa fue de ~ 1.2 . Teniendo en cuenta los balances de carbono y redox, se puede determinar que esta diferencia depende en gran medida de los grados de reductancia de cada sustrato (γ_S), ya que los valores de $Y_{X/S}$ (rendimiento global de biomasa respecto al sustrato) y γ_X (grado de reductancia de la biomasa) son relativamente cercanos. Esto se corrobora con la expresión del RQ deducida a partir de los balances: $RQ = 4(1 - Y_{X/S}) / (\gamma_S - Y_{X/S} \gamma_X)$. Finalmente, la velocidad específica de consumo de sustrato (q_S) fue similar tomando el rango común de velocidades de dilución utilizadas para ambos promotores.

Promotor *AOXI*

Promotor *GAP*

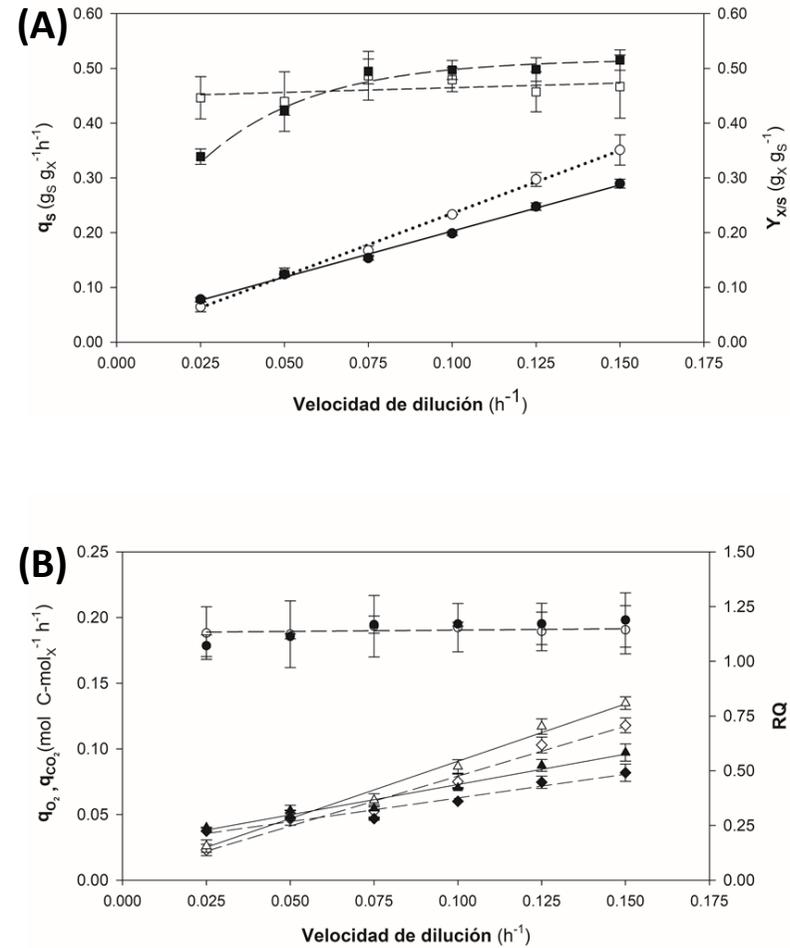
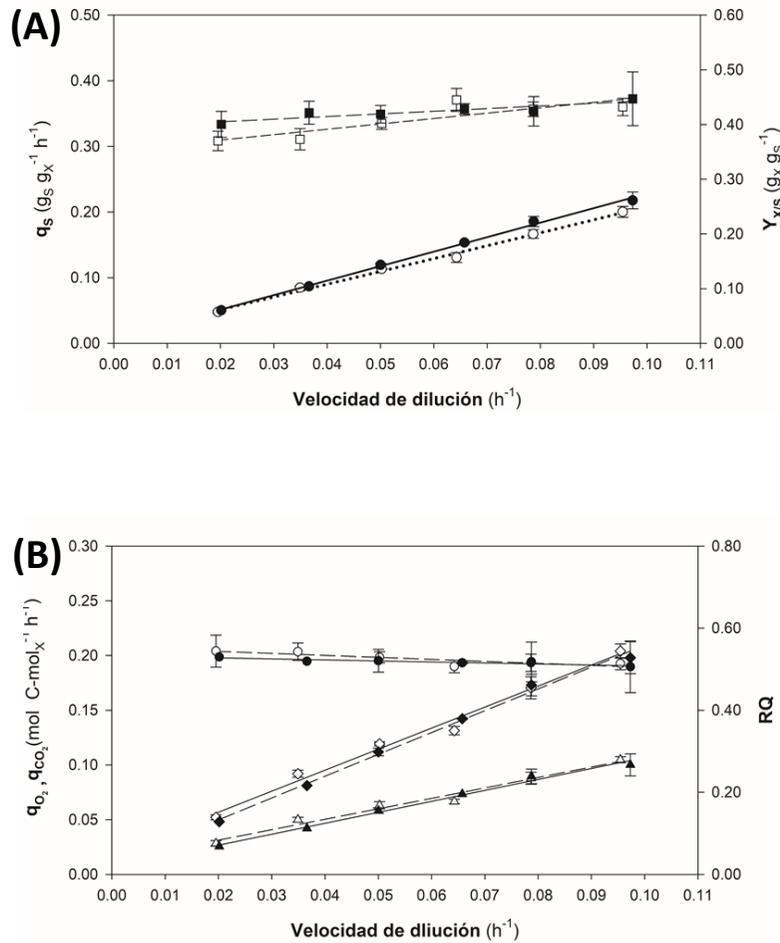


Fig. 6.1. Principales parámetros fisiológicos para cultivos en quimiostato con clones multicopia (símbolos negros) y monocopia (símbolos blancos) haciendo uso de los promotores *AOXI* y *GAP*. **(A):** (●,○) Velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) con metanol (*AOXI*) y glucosa (*GAP*); (■, □) rendimiento global de la biomasa respecto del sustrato Y_{xs} . **(B):** (◆, ◇) velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}); (▲, △) velocidad específica de producción de dióxido de carbono (q_{CO_2}); (●,○) Cociente respiratorio (RQ). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de los valores medios. Los datos obtenidos durante la caracterización del P_{GAP} fueron adaptados de Nieto-Taype *et al.* (2020), mientras que para el P_{AOXI} fueron adaptados de Garrigós-Martínez *et al.* (2019)

6. Comparación de los promotores *GAP* y *AOXI* durante la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

6.2.3 Efecto del uso del P_{AOXI} y el P_{GAP} sobre las cinéticas de producción (*production kinetics*)

Con relación a los principales parámetros relativos a la formación de producto: actividad enzimática (*product-titer*), q_p (velocidad específica de formación de producto), $Y_{P/S}$ (rendimiento de producto respecto al sustrato) y $Y_{P/X}$ (rendimiento del producto respecto a la biomasa), aquellos obtenidos durante la caracterización del P_{GAP} en la expresión de *CRL1* se hallan resumidos en la Tabla 6.1. Los obtenidos en la caracterización del P_{AOXI} se hallan en la Tabla 6.2.

Tabla 6.1. Principales parámetros de producción obtenidos durante la caracterización de clones SCC y MCC de *P. pastoris* expresando *CRL1* bajo el control del promotor *GAP*.

<i>GAP</i>	Clon Mono copia (SCC)						Clon Multicopia (MCC)					
D (h^{-1})	0.025	0.05	0.075	0.10	0.125	0.15	0.025	0.05	0.075	0.10	0.125	0.15
Actividad Crl1 (UA mL^{-1})	39	33	28	29	24	22	234	163	131	106	91	72
Incremento de la actividad Crl1	-	-	-	-	-	-	6.00	4.94	4.75	3.71	3.85	3.28
q_p (UA $g_x^{-1} h^{-1}$)	50	78	89	116	126	139	317	362	371	394	411	405
q_p ratio	-	-	-	-	-	-	6.39	4.63	4.17	3.40	3.26	2.92
$Y_{P/S}$ (10^3 UA g_s^{-1})	0.82	0.62	0.53	0.50	0.42	0.40	4.05	2.92	2.42	1.98	1.66	1.40
$Y_{P/S}$ ratio	-	-	-	-	-	-	4.94	4.75	4.55	3.99	3.91	3.54
$Y_{P/X}$ (10^3 UA g_x^{-1})	1.84	1.40	1.09	1.04	0.93	0.85	11.96	6.92	4.89	3.99	3.33	2.72
$Y_{P/X}$ ratio	-	-	-	-	-	-	6.50	4.94	4.47	3.85	3.59	3.21

Los ratios entre el MCC y SCC fueron calculados dividiendo el valor del parámetro obtenido en el MCC entre el obtenido en el SCC a una similar velocidad de dilución (D). Adaptada de Nieto-Taype *et al.* (2020)

Como primera observación cabe notar que, para cada promotor por separado, los clones MCC y SCC muestran diferencias significativas producidas por la diferente dosis

6. Comparación de los promotores *GAP* y *AOXI* durante la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

génica del *cassette* de expresión de *CRLI* (Tabla 6.1 y 6.2). Existe un claro efecto positivo del número de copias sobre los indicadores de formación de producto, lo cual está de acuerdo con trabajos previos en los que se afirma que el incremento del número de copias ejerce un sinergismo sobre la producción de proteínas recombinantes. No obstante, también es necesario remarcar que este efecto no es lineal, estabilizándose o incluso disminuyendo su valor a partir de un determinado límite de copias (Schwarzahans *et al.*, 2016a; Dagar and Khasa, 2018). El efecto derivado del número de copias para el P_{GAP} ya se analizó con detalle en el capítulo 5; el cual muestra incrementos aproximadamente de 3-6 veces en los parámetros relacionados con la formación de producto. Además, es importante notar que el patrón observado en la velocidad específica de formación de producto (q_P) en el SCC mostró una tendencia lineal, mientras que en el MCC muestra una curva la cual se satura a partir de una $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$. Este comportamiento puede ser debido a la presencia de potenciales restricciones postraduccionales, las cuales serían responsables de que a pesar de haberse detectado un incremento en niveles de expresión de *CRLI* gracias al efecto de la dosis génica en el MCC, el patrón de comportamiento de la q_P no se corresponde de la misma manera.

Por otra parte, al utilizar el P_{AOXI} en la expresión de *CRLI*, los datos reflejan del mismo modo un efecto positivo de la dosis génica sobre la q_P , Y_{PS} y Y_{PX} . Por un lado, la velocidad específica de formación de producto (q_P) mostró diferencias de entre 2.1-2.5 veces entre el MCC y el SCC (Tabla 6.2), mientras que, en los rendimientos del producto respecto a la biomasa (Y_{PX}) y sustrato (Y_{PS}), se observaron mejoras entre 2.0-2.5 y 2-3 veces respectivamente. Las mejoras detectadas al utilizar el clon multicopia con el promotor *AOXI* fueron inferiores a las descritas para el P_{GAP} , lo cual puede tener sentido si se tiene en cuenta la diferente dosis génica de cada uno de los clones multicopia utilizando P_{GAP} (5 copias) o P_{AOXI} (3 copias). Es por ello por lo que para la comparación de promotores se debe tener en cuenta que para los clones multicopia la expresión de *Crl1* no sólo dependerá del tipo de promotor utilizado, sino que deberá considerarse la influencia ejercida por el número de copias sobre los niveles de transcripción durante su interpretación.

6. Comparación de los promotores *GAP* y *AOXI* durante la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

Tabla 6.2. Principales parámetros de producción obtenidos durante la caracterización de clones monocopia y multicopia de *P. pastoris* expresando CrI1 bajo el control del promotor *AOXI*.

<i>AOXI</i>	Clon Monocopia (SCC)						Clon Multicopia (MCC)					
<i>D</i> (h ⁻¹)	0.019	0.035	0.050	0.064	0.079	0.095	0.020	0.036	0.050	0.066	0.079	0.097
Product Titer (UA mL ⁻¹)	124	101	118	107	93	68	321	267	274	243	212	155
Product Titer ratio	-	-	-	-	-	-	2.59	2.64	2.32	2.27	2.28	2.28
<i>q_p</i> (UA g ⁻¹ h ⁻¹)	132	183	306	346	352	312	297	449	646	735	751	656
<i>q_p</i> ratio	-	-	-	-	-	-	2.25	2.45	2.11	2.12	2.13	2.10
<i>Y_{P/S}</i> (10 ³ UA g _s ⁻¹)	2.50	1.96	2.45	2.17	1.92	1.41	6.31	5.52	5.41	4.79	4.05	3.01
<i>Y_{P/S}</i> ratio	-	-	-	-	-	-	2.52	2.8	2.21	2.21	2.11	2.13
<i>Y_{P/X}</i> (10 ³ UA g _x ⁻¹)	6.76	5.25	6.09	4.88	4.48	3.27	15.77	13.08	12.92	11.18	9.55	6.74
<i>Y_{P/X}</i> ratio	-	-	-	-	-	-	2.33	2.49	2.12	2.29	2.13	2.06

Los ratios entre el MCC y SCC fueron calculados dividiendo el valor del parámetro obtenido en el MCC entre el obtenido en el SCC a una similar velocidad de dilución (*D*). Adaptada de Garrigós-Martínez *et al.* (2019).

Teniendo en cuenta que este capítulo busca comparar principalmente el efecto del uso de los promotores *GAP* y *AOXI*, la presente discusión estará mayormente enfocada a la comparación del efecto derivado de su uso más que al efecto producido por la dosis génica. Así, se empezará la comparativa tomando en cuenta los clones SCC de ambos promotores para luego analizar los cambios observados en los clones MCC.

En primer lugar, con relación a los clones SCC, en la Fig. 6.2A se representa los valores de velocidad específica de formación de producto (*q_p*) para ambos clones que hacen uso del *P_{AOXI}* y *P_{GAP}*. A lo largo del rango de velocidades de dilución común para ambos clones (denominado rango de cobertura), se observó que el uso del promotor *AOXI* brindó mayores valores en este parámetro. Por otra parte, la tendencia que muestra este parámetro no se encuentra acoplada al crecimiento como se aprecia en SCC regulado bajo el *P_{GAP}*, sino que por encima de una $\mu > 0.06$ h⁻¹ la *q_p* disminuye obteniéndose una curva

6. Comparación de los promotores *GAP* y *AOXI* durante la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

con forma de campana (*bell-shaped*). Dicha tendencia va de acuerdo con previos reportes que la identifican como un patrón común en diversas cepas recombinantes de *P. pastoris* (Looser *et al.*, 2015; Peebo and Neubauer, 2018).

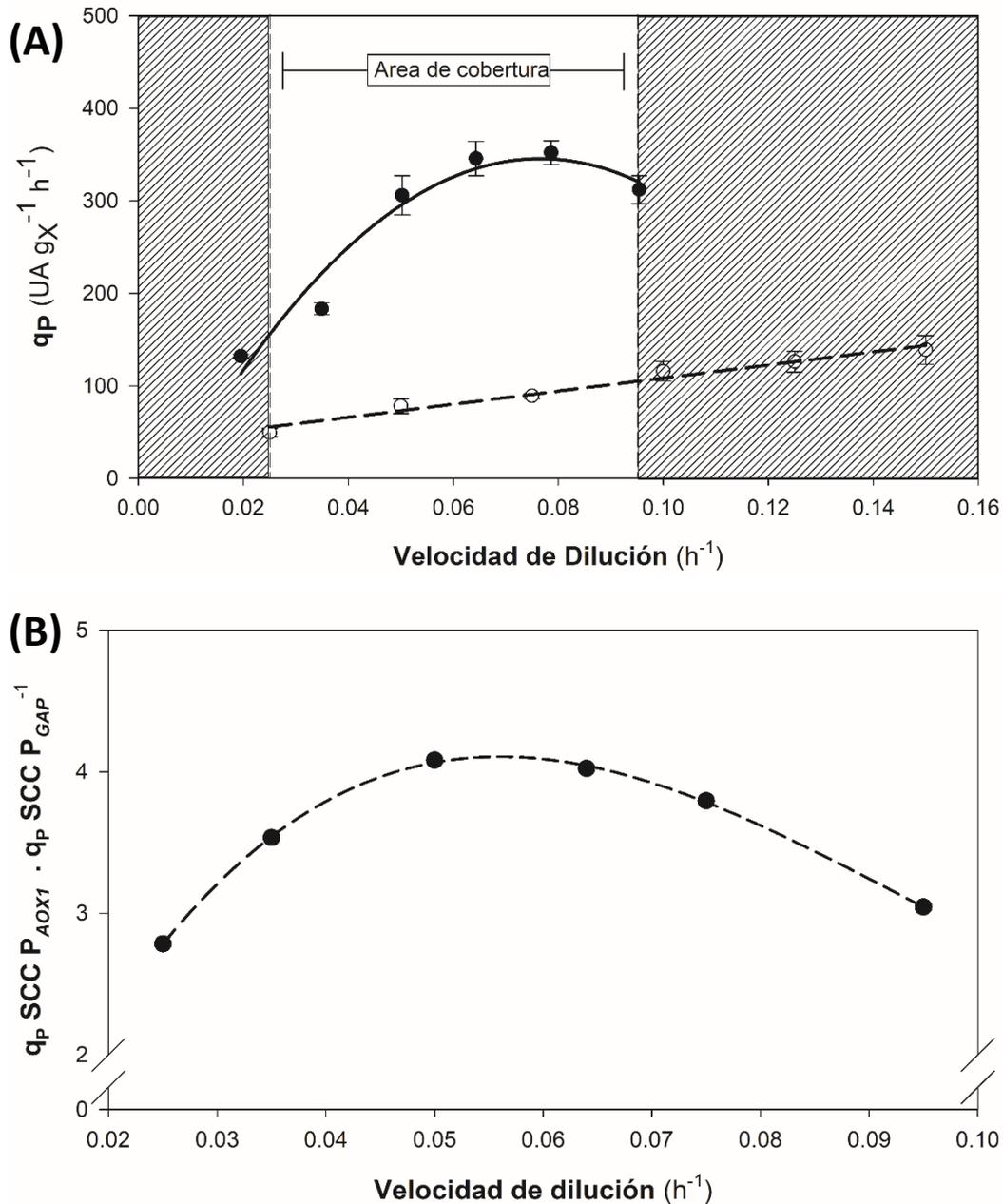


Fig. 6.2. Comparación de las cinéticas de producción en clones de *P. pastoris* expresando *CRL1* bajo la regulación del P_{AOXI} y P_{GAP} en clones monocopia (SCC). **(A):** Velocidad específica de formación de producto (q_P) con el promotor *AOXI* (●) y *GAP* (○). **(B):** (●) Ratio obtenido al dividir los valores de q_P entre ambos promotores. Las barras de error en la Fig. 21A representan la desviación estándar (SD) de los valores medios.

El conocimiento del comportamiento de la q_P ofrece información muy útil para el diseño racional de bioprocesos, ya que permite determinar los valores de μ que maximizarían la formación de producto y su productividad, bien como variación de $\mu(t)$ o valor singular (μ_{opt}) (Maurer *et al.*, 2006; Ponte *et al.*, 2018). En este caso, ésta se encontraría dentro del rango de 0.05-0.095 h⁻¹. Por el contrario, en el clon regulado por el P_{GAP} al contar con una tendencia lineal, la formación de producto se vería favorecida conforme se trabaje cerca de la μ máxima (μ_{max}), siempre y cuando se buscara obtener los mayores valores en términos de la q_P .

Se ha demostrado que en clones expresando proteínas recombinantes bajo el P_{AOXI} la presencia de posibles limitaciones en los factores de transcripción (*transcription factor*, TF) de los genes involucrados en el metabolismo de metanol (MUT) tales como Mit1 (Garrigós-Martínez *et al.*, 2019), Mxr1 o Pmr1 (Wang *et al.*, 2016) los cuales podrían ser los responsables del patrón de la cinética de producción en forma de campana, ya que son compartidos a su vez por la maquinaria encargada de la expresión de la proteína recombinante, lo cual desencadena una competencia por los TF para ambos procesos. Así es posible generar la hipótesis que este hecho sería el responsable de que a partir de una determinada velocidad específica de crecimiento los recursos en términos de TF's sean destinados más al consumo de metanol que a la formación de producto y, por lo tanto, disminuyendo la tasa de síntesis de Cr11. Sin embargo, serían necesarios estudios más amplios para validar dicha hipótesis.

Al calcular los ratios derivados de dividir los valores de q_P de los clones SCC (Fig. 6.2B) se revela que las diferencias entre el uso de un promotor u otro fluctúa entre 3-4 veces dependiendo de la μ de operación a favor del promotor *AOXI*, dando como resultado del mismo modo una curva con forma de campana. Dicha información es consistente con una serie de estudios los cuales demuestran la superioridad del P_{AOXI} sobre el P_{GAP} (Boer *et al.*, 2000; Vassileva *et al.*, 2001; Ragon *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Sin embargo es importante tener en cuenta que de igual forma existen trabajos similares que sustentan lo opuesto (Goodrick *et al.*, 2001; Menéndez *et al.*, 2004). Los trabajos anteriores se han realizado en diferentes modos de operación y sin estudiar el efecto de la μ en la ratio, por lo que son estudios parciales. Además, se considera generalmente que las cinéticas de producción (*production kinetics*) pueden ser altamente dependientes de la proteína recombinante expresada y de las características intrínsecas

del clon utilizado (García-Ortega *et al.*, 2019), con lo que tendrían que ser determinadas empíricamente para cada caso.

Con relación a los resultados obtenidos de los rendimientos del producto respecto a la biomasa ($Y_{P/X}$) y al sustrato ($Y_{P/S}$) (Fig. 6.3), para el caso del P_{AOXI} , se exhibe un patrón lineal decreciente en ambos parámetros, lo cual significa que a medida que se trabaje a velocidades lentas de dilución se obtendrán mayores rendimientos. Así, se puede determinar que este comportamiento está fuertemente ligado a la tendencia observada en la q_P , ya que los valores obtenidos no llegan a ser directamente proporcionales al aumento de la velocidad específica de crecimiento (μ) ni a los valores de q_S (ambos con patrones lineales positivos), por lo tanto, disminuyendo los respectivos rendimientos de la formación de producto. Por el contrario, en el SCC controlado por el P_{GAP} , los valores de $Y_{P/X}$ y $Y_{P/S}$ presentan un patrón casi constante, generando ligeras variaciones de dichos parámetros entre cada velocidad de dilución debido que, para este caso, al utilizar el P_{GAP} , a diferencia de lo previamente descrito para el P_{AOXI} , el incremento de q_P está fuertemente acoplado a la μ y la q_S . Las variaciones entre el uso de un promotor u otro para $Y_{P/X}$ y $Y_{P/S}$ fueron de ~ 3 -4 y ~ 3.25 veces respectivamente

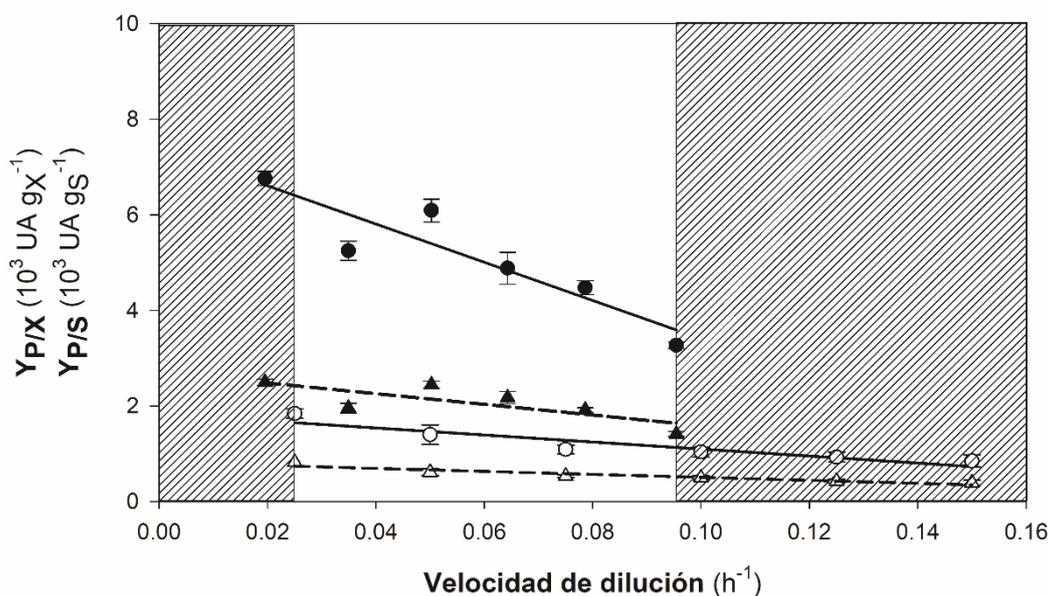


Fig. 6.3: Comparación del rendimiento global de formación de producto respecto a la biomasa ($Y_{P/X}$) (●,○) y al sustrato ($Y_{P/S}$) (▲,△) utilizando el promotor *AOXI* (símbolos negros) y el promotor *GAP* (símbolos blancos) en la expresión de *CRL1* en clones mono copia (SCC). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de los valores medios.

6. Comparación de los promotores *GAP* y *AOXI* durante la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

Para poder realizar la comparativa del uso del P_{AOXI} y P_{GAP} en los clones multicopia (MCC), se tuvo en cuenta la posibilidad de un análisis directo de los resultados, sin embargo, esto podría llevar a interpretaciones erróneas debido a que ambos clones cuentan con una diferente dosis génica integrada (3 y 5 copias respectivamente). Por lo tanto, se optó por normalizar los datos obtenidos dividiendo los valores analizados entre el número de copias.

La Fig. 6.4 muestra los valores normalizados de q_P para los clones MCC. Mientras que en el caso del P_{AOXI} , el MCC presenta el mismo patrón descrito anteriormente en el SCC (*bell-shaped*), en los clones regulados por el P_{GAP} la tendencia cambia de ser lineal (SCC) a una curva que se satura a partir de una $\mu > 0.10 \text{ h}^{-1}$ (MCC) tal como fue expuesto en el capítulo 4 pudiendo estar vinculado al hecho que durante el uso del promotor *GAP* se puede llegar a trabajar a velocidades mucho mayores que utilizando el P_{AOXI} , por lo tanto al trabajar a velocidades altas se pueden generar sobrecargas y/o limitaciones en la maquinaria encargada de la síntesis y procesamiento de proteínas hasta su secreción (Puxbaum *et al.*, 2015), ya que las células priorizarían los recursos a la síntesis de las enzimas involucradas en el metabolismo de la fuente de carbono (glucosa).

Por otra parte, vale la pena resaltar los valores de q_P normalizados para ambos promotores muestran valores inferiores en comparación a los SCC, con la excepción de una $\mu = 0.025 \text{ h}^{-1}$ para el P_{GAP} donde se exhibe el mismo efecto. Por lo tanto, se puede confirmar que no hay una contribución directa entre el número de copias y las veces que incrementa la q_P (independientemente del promotor utilizado) debido posiblemente a las limitaciones que genera la sobreexpresión de *CRL1* en los clones MCC.

Por otra parte, al representar las ratios obtenidos al dividir la q_P de los MCC regulados bajo el P_{AOXI} y el P_{GAP} en el rango común de velocidades de dilución (D) (Fig. 6.4B), se muestra un patrón con forma de campana similar al descrito previamente para los SCC (Fig. 21B). De esta forma, si se comparan los promedios de los ratios obtenidos en cada figura se puede apreciar que este valor para los SCC se encuentra a ~ 3.5 (Fig. 6.2B) mientras que para los MCC está alrededor de 3 (Fig. 6.4B); lo cual sustenta el hecho que, a pesar de utilizar clones con diferente dosis génica, al ser normalizados, mantienen diferencias similares entre el uso de los promotores *AOXI* o *GAP* a las observadas en los clones SCC. Esta observación fortalece la evidencia de que para la producción de Crl1 el uso del promotor *AOXI* muestra claras ventajas sobre el *GAP* respecto a la q_P .

6. Comparación de los promotores *GAP* y *AOXI* durante la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

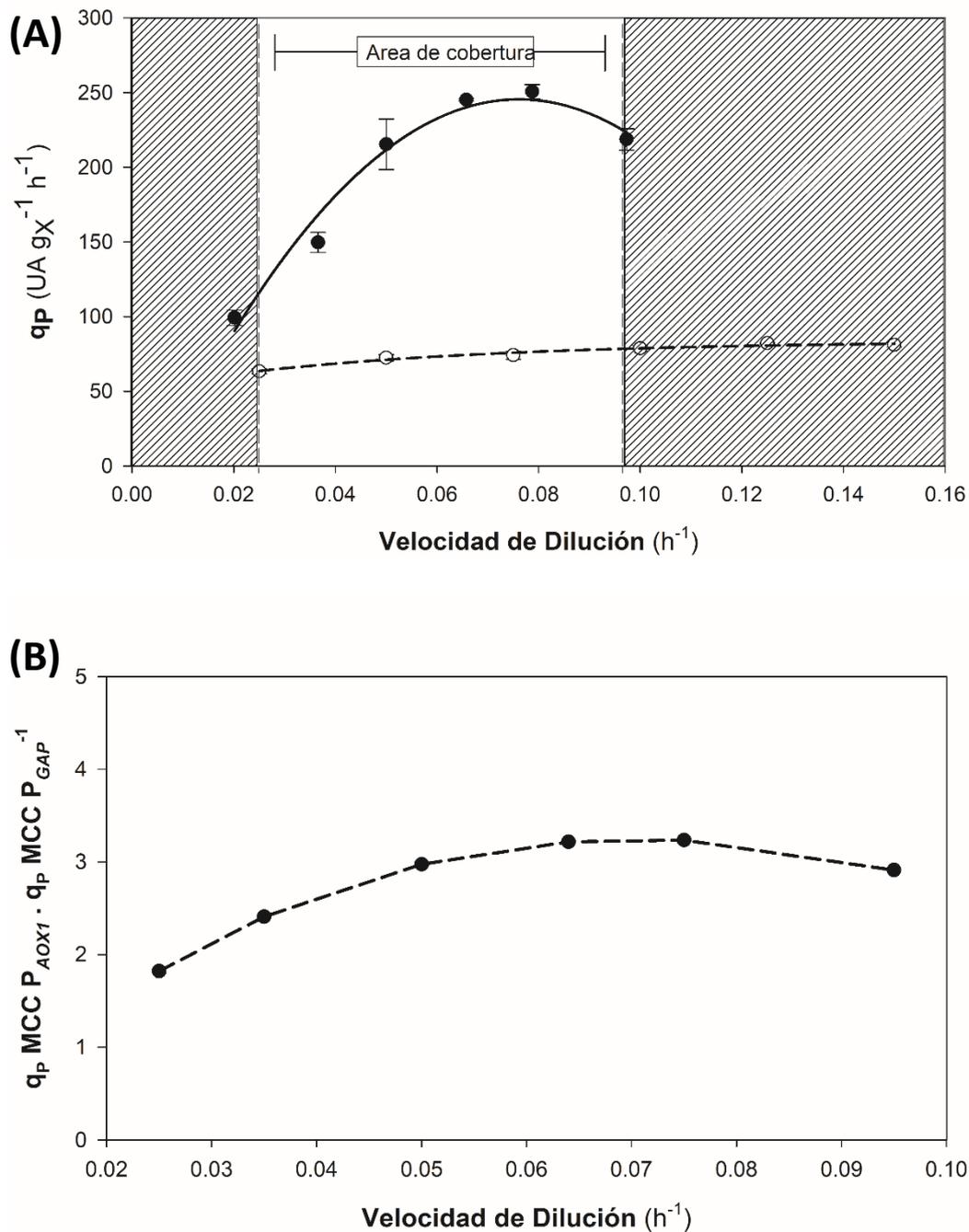


Fig. 6.4. Comparación de las cinéticas de producción normalizadas (entre el número de copias) en clones de *P. pastoris* expresando *CRL1* bajo la regulación de los promotores *AOXI* y *GAP* en clones multicopia (MCC). **(A):** Velocidad específica de formación de producto (q_p) con el promotor *AOXI* (●) y *GAP* (○). **(B):** (●) Ratio obtenido al dividir los valores de q_p entre ambos promotores. Las barras de error en la Fig. 21A representan la desviación estándar (SD) de los valores medios normalizados.

Finalmente, con relación a los rendimientos $Y_{P/X}$ y $Y_{P/S}$, se hizo del mismo modo la normalización de los datos entre el número de copias presente en cada clon. De esta forma, en la Fig. 6.5, el clon regulado bajo el P_{AOXI} mostró una tendencia lineal de pendiente negativa para ambos rendimientos tal como en el SCC. No obstante, los valores

6. Comparación de los promotores *GAP* y *AOXI* durante la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

obtenidos para ambos parámetros fueron inferiores en el MCC, lo cual es lógico teniendo en cuenta que la q_P mostró del mismo modo valores reducidos. Sin embargo, los rendimientos para este clon fueron superiores a los observados con el respectivo MCC regulado bajo el promotor *GAP*. Este último mostró una tendencia muy diferente a la observada en su respectivo SCC al cambiar de un patrón casi constante a una curva decreciente con disminución sustancial de los valores de $Y_{P/X}$ y $Y_{P/S}$ a mayores velocidades de dilución (D). Tal como se sostiene en el capítulo 4, dicho cambio puede deberse a la presencia de cuellos de botella en los procesos de síntesis, ensamblaje y/o secreción de proteínas los cuales general finalmente una saturación del sistema (Nieto-Taype *et al.*, 2020).

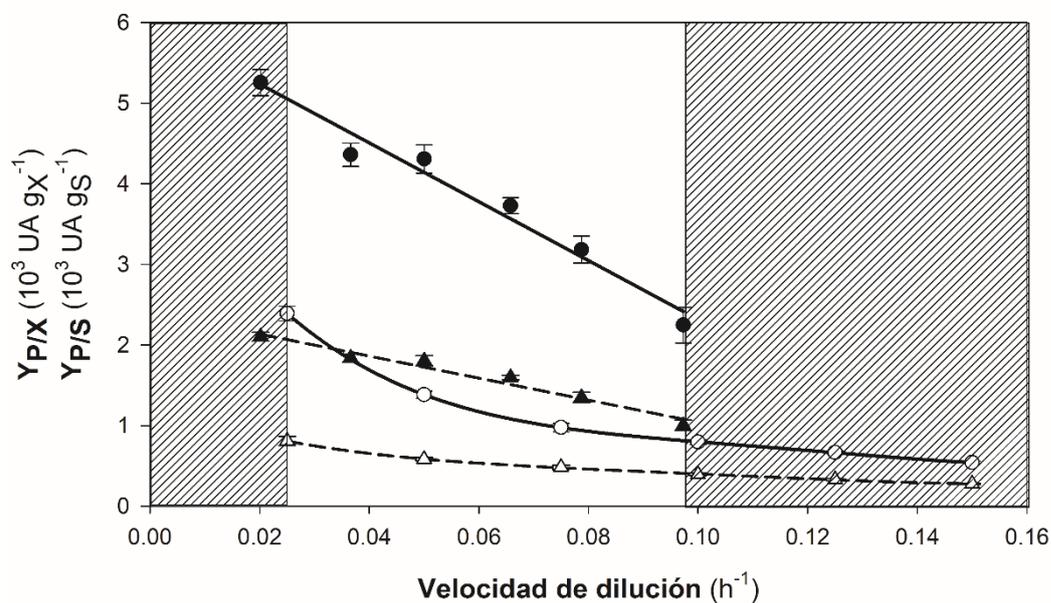


Fig. 6.5. Comparación del rendimiento global normalizado de formación de producto respecto a la biomasa ($Y_{P/X}$) (●,○) y al sustrato ($Y_{P/S}$) (▲,△) utilizando el promotor *AOXI* (símbolos negros) y el promotor *GAP* (símbolos blancos) en la expresión de *CRL1* en clones multicopia (MCC). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de los valores medios.

En resumen, se puede concluir que para la síntesis de *Crl1* mediante el uso de la factoría celular *P. pastoris*, el promotor *AOXI* muestra claras ventajas sobre el uso del P_{GAP} en los parámetros relacionados con la formación de producto, tal como se refleja en los valores obtenidos de q_P , $Y_{P/X}$ y $Y_{P/S}$ a lo largo del plano de diluciones estudiado. Sin embargo, esto no significa que la plataforma de expresión basada en el P_{GAP} sea descartada, considerando que, por ejemplo, si se observan los valores de q_P obtenidos con el clon multicopia (Tabla 6.1) se acercan mucho a los valores obtenidos con el SCC que utiliza el P_{AOXI} (Tabla 6.2). Por lo tanto, se abre la posibilidad de alcanzar los mismos

6. Comparación de los promotores *GAP* y *AOXI* durante la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

niveles de producción observados en el MCC regulado bajo el P_{AOXI} mediante el uso de herramientas propias de la biología molecular (Ata *et al.*, 2017), así como del diseño de novedosas estrategias de bioproceso (Garcia-Ortega *et al.*, 2016; Adelantado *et al.*, 2017) que permitan maximizar el rendimiento de dicho promotor tal como se sustenta en estudios previos.

De esta forma se puede concluir que el uso de sistemas de expresión basados en el P_{AOXI} y en el P_{GAP} puede ser válido para la producción de Cr11 a escala de laboratorio. Sin embargo, la optimización del bioproceso estará asociada al criterio de eficiencia utilizado (productividad o producto final) y por las cinéticas de producción observadas en cada clon, el cual permitirá su implementación en cultivos en modo de operación *fed-batch* que incrementen la eficacia de la producción de Cr11. De este modo, para el caso del P_{AOXI} tanto para el SCC y el MCC, las productividades se verán favorecidas en rangos de μ cercana y ligeramente mayores a la q_P máxima, mientras la actividad final será favorecida en rangos de μ ligeramente inferiores. Por otro lado, para el P_{GAP} para el SCC ambos indicadores serán óptimos trabajando cerca de la μ máxima, mientras que en el MCC será preferible trabajar a μ cercanas al punto de saturación de la q_P . Al tener en cuenta que se busca la implementación de ambos sistemas en la obtención de productos de alto valor añadido, la optimización de rendimientos no sería tan trascendente como los indicadores previamente valorados.

Finalmente, se deberá realizar una evaluación global incluyendo aspectos económicos y de facilidad de operación en planta para determinar la posible viabilidad económica del bioproceso, sobre todo por los inconvenientes que supone el manejo de metanol como sustrato durante la implementación del uso del P_{AOXI} .

6.3 Referencias

- Adelantado, N., Tarazona, P., Grillitsch, K., García-Ortega, X., Monforte, S., Valero, F., *et al.* (2017) The effect of hypoxia on the lipidome of recombinant *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **16**: 86.
- Ata, Ö., Prielhofer, R., Gasser, B., Mattanovich, D., and Çalik, P. (2017) Transcriptional engineering of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for improved heterologous protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* **114**: 2319–2327.
- Barrero, J.J., Casler, J.C., Valero, F., Ferrer, P., and Glick, B.S. (2018) An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **17**: 161.
- Barrigón, J.M., Montesinos, J.L., and 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? *Biochem Eng J* **75**: 47–54.
- Boer, H., Teeri, T.T., and Koivula, A. (2000) Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7a secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. *Biotechnol Bioeng* **69**: 486–494.
- Burgard, J., Gruber-Grünwald, C., Altmann, F., Zanghellini, J., Valli, M., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2019) The secretome of *Pichia pastoris* in fed-batch cultivations is largely independent of the carbon source but changes quantitatively over cultivation time. *Microb Biotechnol* 1751-7915.13499.
- Çalik, P., Ata, Ö., Güneş, H., Massahi, A., Boy, E., Keskin, A., *et al.* (2015) Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochem Eng J* **95**: 20–36.
- Cámara, E., Landes, N., Albiol, J., Gasser, B., Mattanovich, D., and Ferrer, P. (2017) Increased dosage of *AOXI* promoter-regulated expression cassettes leads to transcription attenuation of the methanol metabolism in *Pichia pastoris*. *Sci Rep* **7**: 44302.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 45–66.
- Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J.L., Ferrer, P., Cregg, J.M., and Valero, F. (2005) Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *J Biotechnol* **117**: 321–335.
- Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P., and Stillman, C.A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* **9**: 1316–1323.
- Dagar, V.K. and Khasa, Y.P. (2018) Combined effect of gene dosage and process optimization strategies on high-level production of recombinant human interleukin-3 (hIL-3) in *Pichia pastoris* fed-batch culture. *Int J Biol Macromol* **108**: 999–1009.

- Daly, R. and Hearn, M.T.W. (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit* **18**: 119–138.
- Delroisse, J.M., Dannau, M., Gilsoul, J.J., El Mejdoub, T., Destain, J., Portetelle, D., *et al.* (2005) Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **42**: 286–294.
- Ergün, B.G., Gasser, B., Mattanovich, D., and Çalık, P. (2019) Engineering of alcohol dehydrogenase 2 hybrid-promoter architectures in *Pichia pastoris* to enhance recombinant protein expression on ethanol. *Biotechnol Bioeng* **116**: 2674–2686.
- Fischer, J.E. and Glieder, A. (2019) Current advances in engineering tools for *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* **59**: 175–181.
- García-Ortega, X., Adelantado, N., Ferrer, P., Montesinos, J.L., and Valero, F. (2016) A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*: From specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. *Process Biochem* **51**: 681–691.
- García-Ortega, X., Cámara, E., Ferrer, P., Albiol, J., Montesinos-Seguí, J.L., and Valero, F. (2019) Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol free *GAP* promoter. Where do we stand? *N Biotechnol* **53**: 24–34.
- García-Ortega, X., Ferrer, P., Montesinos, J.L., and Valero, F. (2013) Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive *GAP* promoter. *Biochem Eng J* **79**: 172–181.
- García-Ortega, X., Valero, F., and Montesinos-Seguí, J.L. (2017) Physiological state as transferable operating criterion to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris* through oxygen limitation. *J Chem Technol Biotechnol* **92**: 2573–2582.
- Garrigós-Martínez, J., Nieto-Taype, M.A., Gasset-Franch, A., Montesinos-Seguí, J.L., García-Ortega, X., and Valero, F. (2019) Specific growth rate governs *AOXI* gene expression, affecting the production kinetics of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) P_{AOXI} -driven recombinant producer strains with different target gene dosage. *Microb Cell Fact* **18**: 187.
- Gasser, B., Prielhofer, R., Marx, H., Maurer, M., Nocon, J., Steiger, M., *et al.* (2013) *Pichia pastoris*: Protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiol* **8**: 191–208.
- Gidijala, L., Uthoff, S., Kampen, S.J., Steinbüchel, A., and Verhaert, R.M.D. (2018) Presence of protein production enhancers results in significantly higher methanol-induced protein production in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **17**: 112.
- Goodrick, J.C., Xu, M., Finnegan, R., Schilling, B.M., Schiavi, S., Hoppe, H., and Wan, N.C. (2001) High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnol Bioeng* **74**: 492–497.
- Guerfal, M., Ryckaert, S., Jacobs, P.P., Ameloot, P., Van Craenenbroeck, K., Derycke, R., and Callewaert, N. (2010) The *HACI* gene from *Pichia pastoris*: Characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and

- membrane proteins. *Microb Cell Fact* **9**: 49.
- Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N., and Mattanovich, D. (2004) Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* **85**: 367–375.
- Jungo, C., Marison, I., and 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. *J Biotechnol* **128**: 824–837.
- Juturu, V. and Wu, J.C. (2018) Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: Latest research progress and applications. *ChemBioChem* **19**: 7–21.
- Kang, Z., Huang, H., Zhang, Y., Du, G., and Chen, J. (2017) Recent advances of molecular toolbox construction expand *Pichia pastoris* in synthetic biology applications. *World J Microbiol Biotechnol* **33**: 19.
- Kim, S.J., Lee, J.A., Kim, Y.H., and Song, B.K. (2009) Optimization of the functional expression of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by varying the host and promoter. *J Microbiol Biotechnol* **19**: 966–971.
- Liu, W.-C., Inwood, S., Gong, T., Sharma, A., Yu, L.-Y., and Zhu, P. (2019) Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. *Crit Rev Biotechnol* **39**: 258–271.
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., et al. (2015) Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv* **33**: 1177–1193.
- Looser, V., Lüthy, D., Straumann, M., Hecht, K., Melzoch, K., and Kovar, K. (2017) Effects of glycerol supply and specific growth rate on methanol-free production of CALB by *P. pastoris*: functional characterisation of a novel promoter. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**: 3163–3176.
- Maurer, M., Kühleitner, M., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2006) Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **5**: 37.
- Menéndez, C., Hernández, L., Banguela, A., and País, J. (2004) Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* **34**: 446–452.
- Müller, J.M., Bruhn, S., Flaschel, E., Friehs, K., and Risse, J.M. (2016) *GAP* promoter-based fed-batch production of highly bioactive core streptavidin by *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog* **32**: 855–864.
- Nieto-Taype, M.A., Garrigós-Martínez, J., Sánchez-Farrando, M., Valero, F., Garcia-Ortega, X., and Montesinos-Seguí, J.L. (2020) Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Microb Biotechnol* **13**: 315–327.
- Nordén, K., Agemark, M., Danielson, J.Å.H., Alexandersson, E., Kjellbom, P., and Johanson, U. (2011) Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol* **11**: 47.

- Peebo, K. and Neubauer, P. (2018) Application of continuous culture methods to recombinant protein production in microorganisms. *Microorganisms* **6**: 56.
- Peña, D.A., Gasser, B., Zanghellini, J., Steiger, M.G., and Mattanovich, D. (2018) Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metab Eng* **50**: 2–15.
- Ponte, X., Barrigón, J.M., Maurer, M., Mattanovich, D., Valero, F., and Montesinos-Seguí, J.L. (2018) Towards optimal substrate feeding for heterologous protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella* spp) fed-batch processes under P_{AOXI} control: a modeling aided approach. *J Chem Technol Biotechnol* **93**: 3208–3218.
- Ponte, X., Montesinos-Seguí, J.L., and Valero, F. (2016) Bioprocess efficiency in *Rhizopus oryzae* lipase production by *Pichia pastoris* under the control of P_{AOXI} is oxygen tension dependent. *Process Biochem* 1–10.
- Potvin, G., Ahmad, A., and Zhang, Z. (2012) Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J* **64**: 91–105.
- Prielhofer, R., Maurer, M., Klein, J., Wenger, J., Kiziak, C., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2013) Induction without methanol: Novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **12**.
- Puxbaum, V., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2015) Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 2925–2938.
- Ragon, M., Neugnot-Roux, V., Chemardin, P., Moulin, G., and Boze, H. (2008) Molecular gene cloning and overexpression of the phytase from *Debaryomyces castellii* CBS 2923. *Protein Expr Purif* **58**: 275–283.
- Roth, G., Vanz, A.L., Lünsdorf, H., Nimitz, M., and Rinas, U. (2018) Fate of the UPR marker protein Kar2/Bip and autophagic processes in fed-batch cultures of secretory insulin precursor producing *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **17**: 123.
- Schwarzahns, J.P., Wibberg, D., Winkler, A., Luttermann, T., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2016a) Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microb Cell Fact* **15**: 84.
- Schwarzahns, J.P., Wibberg, D., Winkler, A., Luttermann, T., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2016b) Non-canonical integration events in *Pichia pastoris* encountered during standard transformation analysed with genome sequencing. *Sci Rep* **6**: 1–12.
- Valero, F. and López-Santín, J. (2017) Online Analysis for Industrial Bioprocesses: Gas Analysis. Gas Analysis. In, *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls*. Elsevier Inc., pp. 649–678.
- Vassileva, A., Chugh, D.A., Swaminathan, S., and Khanna, N. (2001) Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the *GAP* promoter. *J Biotechnol* **88**: 21–35.
- Veloso, A.C. and Ferreira, E.C. (2017) Online Analysis for Industrial Bioprocesses: Broth Analysis. In, *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls*. Elsevier Inc., pp. 679–704.

6. Comparación de los promotores *GAP* y *AOX1* durante la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

- Vogl, T., Gebbie, L., Palfreyman, R.W., and Speight, R. (2018) Effect of plasmid design and type of integration event on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol* **84**: 2712–2729.
- Vogl, T. and Glieder, A. (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *N Biotechnol* **30**: 385–404.
- Wang, X., Wang, Q., Wang, J., Bai, P., Shi, L., Shen, W., *et al.* (2016) Mit1 transcription factor mediates methanol signaling and regulates the alcohol oxidase 1 (*AOX1*) promoter in *Pichia pastoris*. *J Biol Chem* **291**: 6245–6261.
- Weninger, A., Fischer, J.E., Raschmanová, H., Kniely, C., Vogl, T., and Glieder, A. (2018) Expanding the CRISPR/Cas9 toolkit for *Pichia pastoris* with efficient donor integration and alternative resistance markers. *J Cell Biochem* **119**: 3183–3198.
- Zhu, T., Sun, H., Li, P., Xue, Y., Li, Y., and Ma, Y. (2014) Constitutive expression of alkaline β -mannanase in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem* **49**: 2025–2029.

6. Comparación de los promotores *GAP* y *AOXI* durante la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

7 El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

7.1 Introducción

La factoría celular *Pichia pastoris* (recientemente clasificada como *Komagataella phaffii*) ha sido reconocida como una robusta plataforma de expresión de proteínas recombinantes y síntesis de metabolitos de interés industrial (Ahmad *et al.*, 2014; Gasser and Mattanovich, 2018; Peña *et al.*, 2018). Su capacidad de crecer a altas densidades celulares, de realizar modificaciones postraduccionales y de secretar proteínas al medio extracelular la han situado como una prometedora factoría celular en la industria biotecnológica (Yang and Zhang, 2018).

Fue introducida en el área de la biotecnología a finales de los años 80 (Cregg *et al.*, 1989). La caracterización de la regulación génica de las enzimas responsables de la actividad alcohol oxidasa (Aox1 y Aox2), responsables del consumo de metanol, permitió desarrollar los sistemas de expresión dependientes de los promotores inducibles *AOX1* (P_{AOX1}) y *AOX2* (P_{AOX2}) (Cregg *et al.*, 1993). Específicamente, el P_{AOX1} ha sido ampliamente reconocido por su fuerza y estricta regulación, que ha permitido extender su aplicación con éxito en la producción de un gran número de proteínas recombinantes (RPP) (Jungo *et al.*, 2007; Barrigón *et al.*, 2013; Ponte *et al.*, 2016, 2018; Beiroti *et al.*, 2019). Sin embargo, el uso de metanol como inductor genera una serie de limitaciones a nivel operacional debido a la alta demanda de oxígeno y producción de calor que conlleva su consumo, además de suponer un coste adicional asociado a la aplicación de medidas de seguridad por ser un compuesto altamente inflamable y tóxico (Prielhofer *et al.*, 2013). También se ha observado que puede desencadenar procesos de lisis celular, los cuales implican la liberación de enzimas proteolíticas que pueden afectar la secreción de proteína recombinante (García-Ortega *et al.*, 2019).

Así, el uso del promotor *GAP* (P_{GAP}), encargado de la regulación de la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*TDH3*) (propia de la glicólisis), surgió como una alternativa evitando los problemas derivados del uso de metanol al utilizar fuentes de carbono como glucosa o glicerol (García-Ortega *et al.*, 2019). A diferencia del P_{AOX1} , el P_{GAP} cuenta con una regulación acoplada al crecimiento (constitutiva) la cual ha mostrado ser útil para la expresión de proteínas que no cuenten con efectos tóxicos sobre el crecimiento celular, mostrándose altamente competitivo frente al P_{AOX1} (Çalik *et al.*, 2015). En la literatura se pueden encontrar numerosos trabajos en los que se ha conseguido optimizar la productividad de dicho sistema de expresión (Baumann *et al.*,

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

2008; Müller *et al.*, 2016; García-Ortega *et al.*, 2019). De este modo, el desarrollo de ambos sistemas de expresión, *GAP* y *AOXI* ha demostrado la importancia del uso de los promotores como elementos transcripcionales cruciales que controlan la expresión génica recombinante y esenciales para comprender los mecanismos reguladores involucrados en la misma. Sin embargo, la disponibilidad de sólo estos dos promotores daría un margen muy limitado de trabajo. En ese sentido, la necesidad de incrementar la eficiencia de *P. pastoris* tanto para la RPP como para la síntesis de metabolitos (a través de la ingeniería metabólica) hace necesaria una mayor diversidad de promotores disponibles que sean modulables y con un amplio espectro en los niveles de expresión (Peña *et al.*, 2018). Es así como surge en los últimos años el desarrollo de diversos promotores alternativos con patrones de regulación ya sea constitutiva, inducible o desreprimible como nuevas alternativas (Vogl *et al.*, 2016; Prielhofer *et al.*, 2017; Fischer and Glieder, 2019).

Las tecnologías utilizadas para el desarrollo de nuevos promotores pueden clasificarse en dos tipos: mediante el uso de promotores nativos o mediante el diseño de promotores sintéticos gracias al conocimiento de las secuencias reguladoras presentes en los promotores antes mencionados, así como mediante la *ingenierización* de las mismas (Huang *et al.*, 2014). Respecto al primer caso, básicamente se remite al uso de promotores endógenos relacionados a las rutas metabólicas, como por ejemplo aquéllas de dónde provienen los promotores *GAP* (P_{PGK1} , P_{PYK} , P_{PDC}) (Moreira de Almeida *et al.*, 2005; Massahi and Çalık, 2018) y *AOXI* (P_{DASI} , P_{CAT1} , P_{FLD1} , P_{PEX5} , etc) (Gasser *et al.*, 2015; Vogl *et al.*, 2016). Por otra parte, los promotores sintéticos se desarrollan a través de la modificación de la secuencia original de promotores nativos en base al conocimiento previo respecto a los elementos reguladores (Yang and Zhang, 2018).

Dentro de la estructura de los promotores, las secuencias reguladoras propias del promotor pueden clasificarse en: elementos reguladores *cis* (*CRM*), en donde se encuentran los sitios de unión a los factores de transcripción (*TFBS*), y secuencias centrales del promotor (*core promoter sequences*), las cuales están vinculadas con el inicio de la transcripción al unirse la RNA polimerasa II que da inicio al proceso de transcripción (Portela *et al.*, 2018; Prielhofer *et al.*, 2018). Ambas regiones han sido utilizadas con éxito obteniéndose resultados prometedores en la generación de nuevos promotores mediante la duplicación, delección y/o la combinación de dichas regiones (Vogl *et al.*, 2014; Ata *et al.*, 2017; Portela *et al.*, 2017, 2018). Sin embargo, la mayoría de los estudios fueron realizados en cultivos a pequeña escala (matraces), siendo necesaria

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

una completa caracterización a nivel de biorreactor que permita maximizar la formación de producto en función de las cinéticas de producción (*production kinetics*). Así, Prielhofer *et al.* (2018) llevó a cabo la caracterización del promotor *GTH1*, un promotor reprimido en condiciones de exceso de glicerol e inducido por condiciones limitantes de glucosa, a diferentes velocidades específicas de crecimiento (μ), lo cual permitió el diseño de una estrategia dinámica con el tiempo en operación *fed-batch* a μ variable. En ese sentido, el uso de quimiostatos ha mostrado ser la estrategia más adecuada para la caracterización del bioproceso (Hoskisson and Hobbs, 2005), debido a que permite trabajar en condiciones del estado estacionario ofreciendo resultados robustos y de gran reproducibilidad. Este hecho ha quedado claramente demostrado a lo largo de la experiencia del grupo de investigación, así como en la presente tesis doctoral donde se ha conseguido caracterizar con éxito el comportamiento de diversos clones recombinantes de *P. pastoris* regulados con diferentes promotores y con diferentes dosis génicas en una serie de estudios que han permitido la determinación de las condiciones óptimas de bioproceso que hagan posible maximizar la producción a escala de fermentador (García-Ortega *et al.*, 2016; Garrigós-Martínez *et al.*, 2019; Nieto-Taype *et al.*, 2020).

El trabajo presentado en este capítulo forma parte del proyecto europeo IBISBA 1.0, el cual se ha desarrollado en colaboración con la *Graz University of Technology* (TUGraz-Austria), *VTT Technical Research Centre of Finland* (VTT Ltd, Finland) y la empresa de base biotecnológica *Biology for synthesis* (Bisy GmbH, Austria). Este consistió en la obtención y caracterización de diversos clones productores de *P. pastoris* regulados bajo el control de nuevos promotores que expresan la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB), una enzima de interés para la industria farmacéutica, química y alimentaria (Lima *et al.*, 2019). El estudio abarcó desde la obtención de los clones y el *screening* en *deep well plates* (DWP's), hasta la caracterización de las cinéticas de producción en modo de operación continuo. La generación de los clones recombinantes fue llevada a cabo en las instalaciones de TUGraz, mientras que la caracterización de las cinéticas de producción en quimiostato se hizo en la Universitat Autònoma de Barcelona en colaboración con el candidato a Doctor Javier Garrigós-Martínez. De este modo, se pudo determinar el efecto del uso de nuevos promotores sobre la RPP como una poderosa herramienta que permitirá explotar satisfactoriamente las capacidades de *P. pastoris* como factoría celular.

7.2 Resultados y discusión

7.2.1 Selección de clones a través del doble *screening*

Los promotores utilizados para la producción de CalB fueron proporcionados por el Prof. Anton Glieder de la TUGraz y CEO de Bisy GmbH, los cuales se denominarán a partir de ahora como P_{G1} y P_{G2} por motivos de confidencialidad. Además, se utilizó el promotor *GAP* (P_{GAP}) como sistema de expresión libre de metanol de referencia para realizar la comparación en términos de eficiencia con los nuevos promotores.

Por lo tanto, con el objetivo de realizar una comparación únicamente del papel de los promotores de interés, el proceso de obtención de clones recombinantes requirió de un proceso de selección, que permitiera obtener clones que cumplieran las características deseadas; es decir, intentar que el *background* genético fuera el máximo de similar posible y que, por lo tanto, la dosis génica del gen de interés fuera igual para todos los clones. Es importante tener en cuenta la capacidad que tiene *P. pastoris* de integrar los vectores de expresión mediante dos sistemas de recombinación: una homóloga, que permite la integración en regiones que muestran homología con la secuencia del vector y no homóloga, que dirige la inserción en regiones aleatorias (Schwarzahans *et al.*, 2017); a lo que se suma la posibilidad de producirse múltiples eventos de inserción de un mismo constructo en el genoma (Schwarzahans *et al.*, 2016b). Por lo tanto, será necesario realizar unos procesos de selección que hagan posible la obtención de clones que cumplan las características deseadas.

En ese sentido, la obtención de clones productores consistió en dos procesos de selección (*screening*). El primero permitió en primera instancia seleccionar los clones positivos candidatos de entre el espectro de variabilidad obtenido durante la transformación, para que en el segundo *screening* fuera validada la información previamente obtenida y se seleccionara finalmente el clon que se utilizaría durante la comparativa de los diferentes promotores. Para ello, se tuvo en cuenta también la determinación del número de copias integradas del *cassette* mediante qPCR, para de ese modo asegurar que el clon seleccionado sólo contara con una copia del *cassette* de expresión (*single-copy clone*, SCC) y poder comparar únicamente el efecto del uso de cada promotor.

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

A continuación, se muestra como ejemplo el proceso de selección de clones realizado para el caso del promotor *GI*, ya que se utilizó la misma metodología para los demás promotores. El ensayo de *screening* se llevó a cabo en *deep well plates* de 96 pocillos los cuales contenían medio BMD (*buffered minimal glucose*) 1 %, para que una vez consumida la fuente de carbono (60 h) se realizaran varios pulsos de BMG (*buffered minimal glycerol*) durante 48 h, tal como se describe en la sección de materiales y métodos.

En la Fig. 7.1A se muestran los resultados de actividad específica relativa obtenidas durante el primer *screening* para los clones regulados bajo el control del P_{GI} . Estos datos fueron normalizados en función de la actividad específica del clon que hizo uso del P_{GAP} y que fue utilizado como referencia. Se puede notar la presencia de clones con diferentes niveles de actividad, lo cual se encuentra en consonancia con lo previamente expuesto con relación a la variabilidad clonal como un proceso intrínseco en *P. pastoris*. En concreto, se puede observar que mientras algunos clones como el B7, C3 y D7 presentan valores inferiores a los que muestra el clon con el promotor *GAP*, otros como el C1 y C2 muestran hasta 4 veces mayor actividad. De este modo, el criterio de selección utilizado no estuvo enfocado en la obtención de clones que mostraran la mayor producción de CalB, debido a que en muchos casos el incremento de actividad puede estar asociado al incremento del número de copias (Schwarzahns *et al.*, 2016a; Vogl *et al.*, 2018). Esto podría generar la probabilidad de elegir clones multicopia, lo cual no es conveniente en el momento de comparar el efecto del uso de diferentes promotores, ya que se estaría añadiendo una fuente de variabilidad (dosis génica), la cual no es deseada para el presente estudio. Por lo tanto, la primera selección se basó en elegir clones cuya actividad estuviera en el rango de la media y sólo 2 que contaran con la mayor actividad específica.

A continuación, el segundo *screening* permitió validar la información obtenida anteriormente, al considerar 5 réplicas biológicas que dieron robustez a los datos obtenidos (Fig. 7.1B). Se puede observar que los clones C1 y C2 se mantuvieron como los clones con mayor productividad específica relativa, mientras que los demás clones mostraron valores alrededor de 2. Así, los clones A5, C2 y D2 fueron seleccionados para la determinación del número de copias que permitió finalmente seleccionar el clon que se utilizaría para realizar la comparativa con los demás promotores.

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

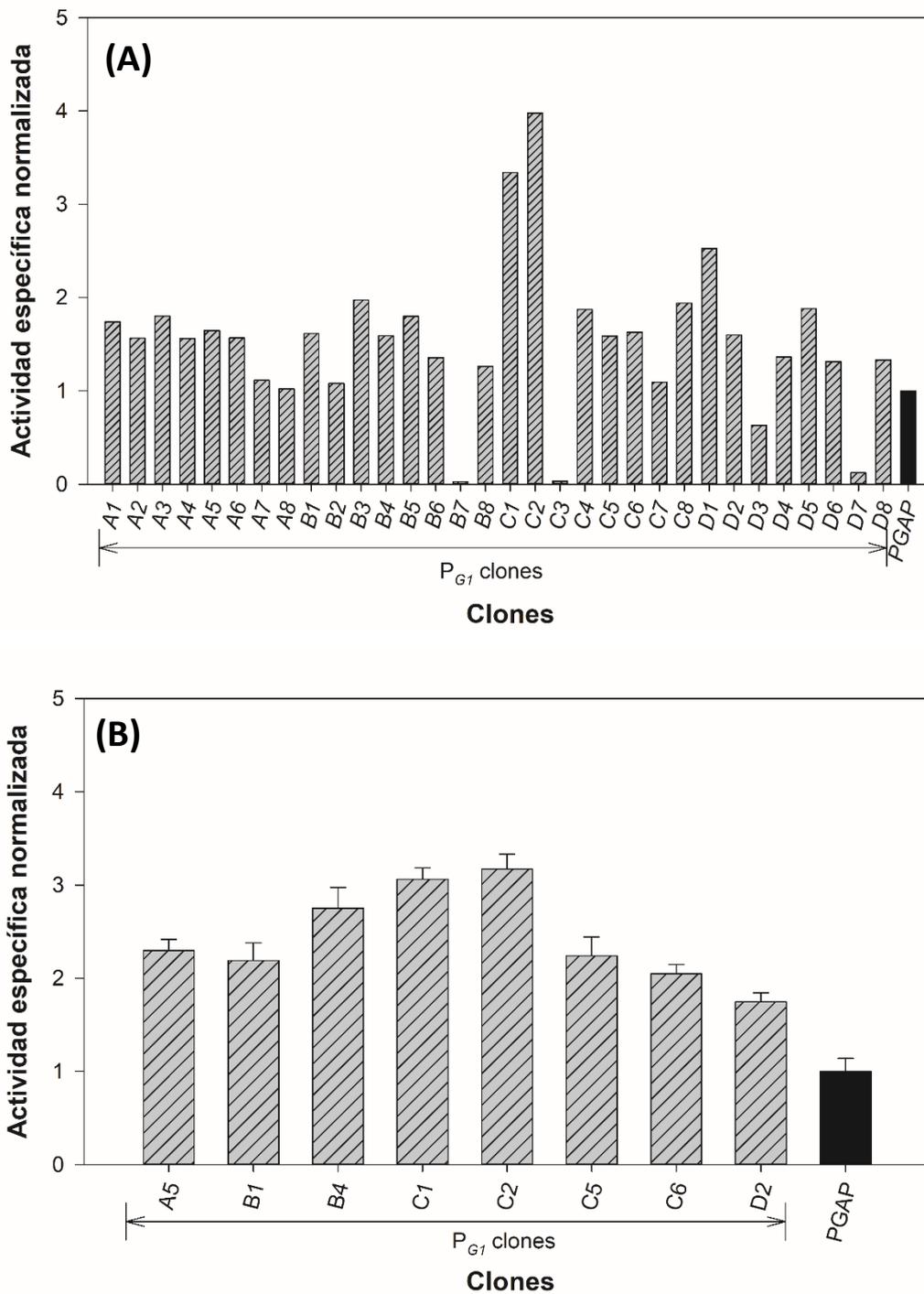


Fig. 7.1. Actividad relativa obtenida durante el primer (A) y segundo (B) proceso de *screening* para la selección de clones productores de CalB regulados bajo el promotor P_{GI}. Se tomó el P_{GAP} como referencia para el cálculo de la actividad relativa. Las barras de error en (B) corresponden a la desviación estándar (SD) de los valores medios.

El análisis de qPCR reveló que los clones A5 y D2 presentaban una copia del *cassette* de expresión integrado mientras que el clon C2 mostró 2 copias integradas. Por consiguiente, el clon A5 fue seleccionado para el estudio comparativo.

7.2.2 Caracterización en *shake flask*

Una vez elegidos los diferentes clones con cada promotor, se procedió a realizar una primera comparativa del comportamiento de diferentes promotores en cultivos de matraz de volumen útil 50 mL. Estos cultivos constaron de dos fases. Una fase de *batch*, la cual permitió generar una biomasa de aproximadamente 5 g L^{-1} , luego de la cual, al agotarse la fuente de carbono (glucosa), se procedió a una fase de alimentación mediante el uso de discos de glicerol (*feed discs*), que liberan dicho sustrato a una velocidad que permite establecer condiciones de carbono limitante en el sistema ($\sim 0.5 \text{ mg h}^{-1}$ por disco). De este modo, se puede obtener rápidamente una primera perspectiva del efecto, en términos generales, del uso de diferentes promotores en la producción de CalB con mayor robustez a los datos previamente obtenidos en DWP.

A continuación, en la Fig. 7.2A se muestran los valores de actividad específica por unidad de biomasa (OD_{600}). Los promotores P_{G1} y P_{G2} manifiestan una clara superioridad en comparación a la cepa control regulada bajo el control del P_{GAP} y evidentemente frente al control negativo, que corresponde a una cepa salvaje (*wild-type-BG11*). Sin embargo, es importante destacar que al finalizar la fase *batch* (17 h), el P_{G1} muestra una actividad específica inferior a la obtenida con el P_{GAP} . No obstante, ésta se incrementa drásticamente durante la fase de alimentación, lo cual sugiere que el promotor adquiere mayor fuerza cuando se generan condiciones de carbono limitante, lo cual está de acuerdo con descripciones previas realizadas para otros promotores (Prielhofer *et al.*, 2013). Por otro lado, el P_{G2} manifiesta desde un inicio altos valores de actividad específica, con tendencia a la saturación a lo largo de la fase de alimentación, concretamente a partir de las 43 h. Este patrón es muy parecido al observado en el caso del P_{GAP} , aunque para este promotor la saturación se detecta de forma más temprana a partir de las 17 h. Esto sugiere que ambos promotores tendrían un posible comportamiento constitutivo, ya que en ambos casos durante la fase de alimentación los *feed discs* liberan el glicerol a una velocidad muy lenta. Como consecuencia, es de esperar que la velocidad específica de crecimiento se vea afectada junto a la formación de producto que estaría posiblemente acoplada.

En paralelo, se llevaron a cabo análisis complementarios con relación a la expresión de *CALB*. Así, en la Fig. 7.2B se observa que el clon que utilizó el P_{GAP} mostró los menores niveles de transcripción. Por otra parte, se detecta un comportamiento casi

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

constante de los niveles de transcripción de *CALB* con una reducción de los niveles de transcripción en la última muestra, muy similar al observado anteriormente en la actividad específica. Desde el final del *batch* se observa una saturación en los niveles de transcripción de *CALB*, lo cual refuerza el hecho de que la expresión de la proteína recombinante estuviera afectada por la baja velocidad específica de crecimiento en la fase de alimentación.

Por otro lado, el P_{G1} muestra un rápido incremento en los niveles de transcripción hasta las 43 h, para luego llegar a un máximo a las ~ 48 h, de acuerdo con lo observado en el análisis de actividad. Sin embargo, a las 65 h se aprecia una ligera disminución de ~15% en dichos niveles, lo cual podría estar en relación con el agotamiento de la fuente de carbono suministrada por los *feed discs*, al casi término de la fase de *fed-batch*. Así, se observa una alta sensibilidad positiva de la expresión respecto a condiciones limitantes de carbono. Sin embargo, al final del cultivo, cuando éstas condiciones llegan a ser muy restrictivas (que sólo permiten sostener el mantenimiento celular) podrían limitar tal efecto, lo cual se ve reflejado en el valor de la última muestra de actividad específica de CalB a las 65 h.

Finalmente, en el clon que es regulado para el control del P_{G2} , al final de la fase *batch* (17 h) se observan mayores niveles de transcripción de *CALB* en comparación con los demás promotores, lo cual explicaría la mayor actividad específica obtenida en este punto. Sin embargo, después de añadir los *feed discs* a pesar de detectarse un incremento significativo de los niveles de transcripción hasta las 43 h, a partir de este punto, la pendiente de dichos incrementos se ve reducida, que podría estar en relación con los valores de actividad específica que casi se mantienen constantes. Es importante notar que la saturación observada en el P_{G2} muestra una menor curvatura a la observada con el P_{GAP} , lo cual puede entenderse que, a pesar de mostrarse acoplado al crecimiento, dicho promotor no sería tan sensible como el P_{GAP} a las condiciones limitantes de carbono.

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

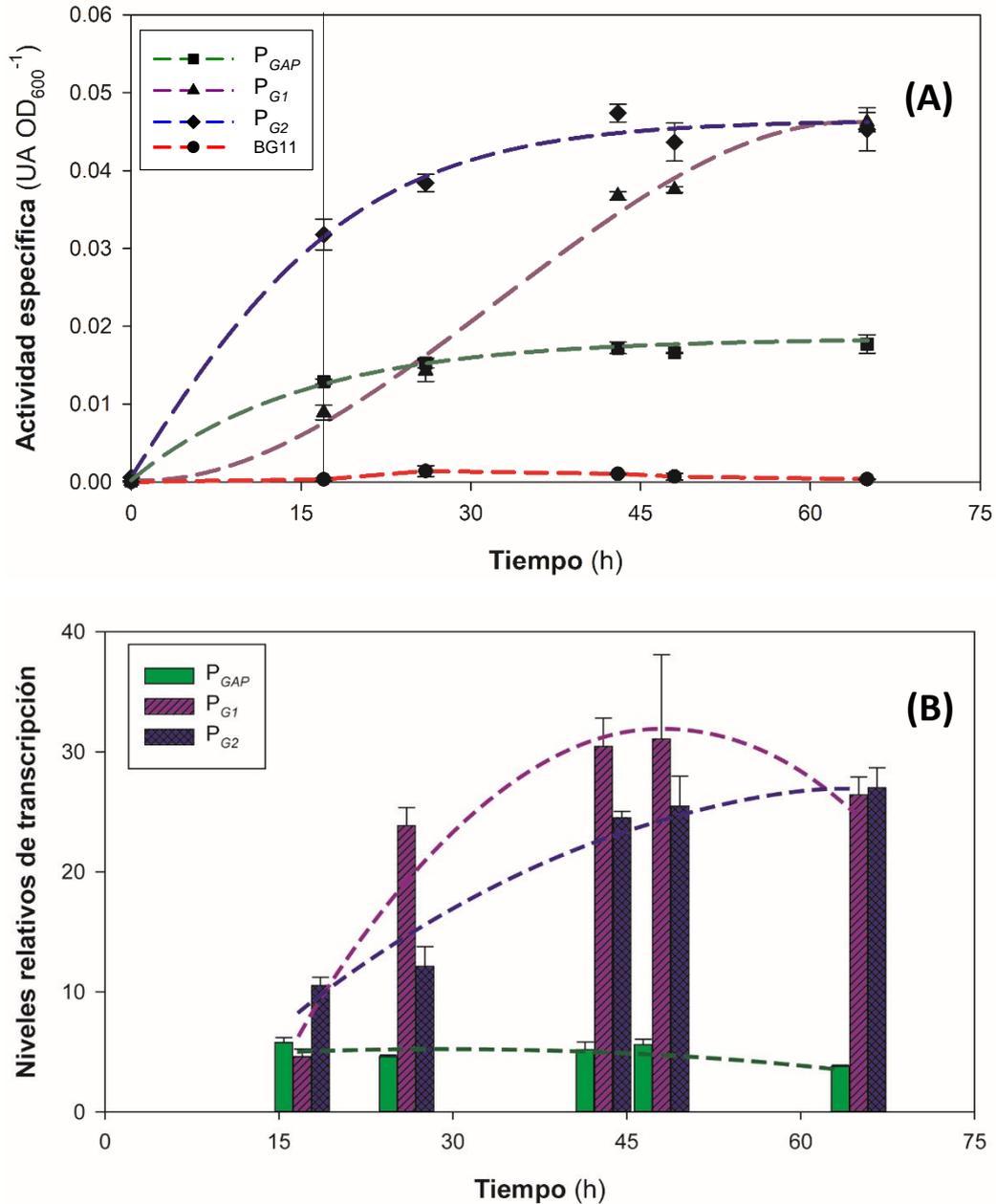


Fig. 7.2. Comparativa del efecto del uso de diferentes promotores sobre la actividad específica de CalB (A) y la expresión del gen correspondiente (B) obtenida en cultivos de matraces Erlenmeyer. La fase de *batch* comprende a las primeras 17 h, a partir de las cuales se procedió con la fase de alimentación al añadir los *feed discs*. La cepa BG11 (*wild-type*) se utilizó como control negativo; por lo tanto, al no mostrar expresión de *CALB* no se graficó en B. Las barras de error en B corresponden a la desviación estándar (SD).

Es de destacar que al final del *fed-batch* los niveles de expresión son muy parecidos frente a los observados en el P_{G1}, posiblemente debido a las limitaciones de este cultivo durante las últimas fases donde la disponibilidad de glicerol se hace muy limitada. Esto explicaría que se obtengan similares actividades específicas al final del cultivo con los diferentes promotores, aunque cuenten con diferentes patrones de actividad específica.

7.2.3 Caracterización del efecto del uso de los nuevos promotores en cultivos en quimiostato

Si bien el estudio comparativo en matraces aportó una primera visión del comportamiento de los nuevos promotores, teniendo en cuenta que este tipo de cultivos no cuenta con un control estricto de los parámetros de bioproceso tales como: pH, agitación, oxígeno disuelto (pO_2) y suministro de fuente de carbono, se puede considerar que la información obtenida a partir de estos cultivos puede ser insuficiente de cara a un posible escalado del bioproceso.

Es por ello, que se hace necesaria la adecuada caracterización que permita conocer las cinéticas de producción (*production kinetics*), así como el comportamiento de los indicadores de estado fisiológico. De esta manera, se espera poder determinar las condiciones óptimas que permitan maximizar la obtención del producto de interés y proponer nuevas estrategias basadas en un diseño racional, como se ha demostrado en los capítulos anteriores.

En ese sentido, en la presente tesis doctoral sólo se han podido recoger los datos obtenidos de cultivos en quimiostato con los clones regulados bajo el control del P_{GAP} y P_{G2} debido a que mostraron similares patrones de comportamiento en el estudio realizado en *shake flask*. Las velocidades específicas de crecimiento estudiadas cubrieron un rango de $0.05-0.15 \text{ h}^{-1}$.

Como se puede observar en la Fig. 7.3, la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) revela un patrón lineal, la cual se ve incrementada junto a la velocidad de dilución ($D=\mu$). No se observaron diferencias significativas a este respecto entre los valores obtenidos para cada uno de los clones. Por lo tanto, se puede interpretar que para este caso la q_s es independiente del promotor utilizado. Al mismo tiempo, el rendimiento global de la biomasa respecto al sustrato estuvo alrededor de $\sim 0.7 \text{ g}_x \text{ g}_s^{-1}$, el cual es un valor ligeramente superior al reportado en estudios previos (alrededor de $0.5 \text{ g}_x \text{ g}_s^{-1}$) (García-Ortega *et al.*, 2013; Robert *et al.*, 2017). Sin embargo, Tomàs-Gamisans *et al.*, (2018) reportó valores muy parecidos durante la validación del modelo metabólico iMT1026 v3.0 en una cepa salvaje.

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

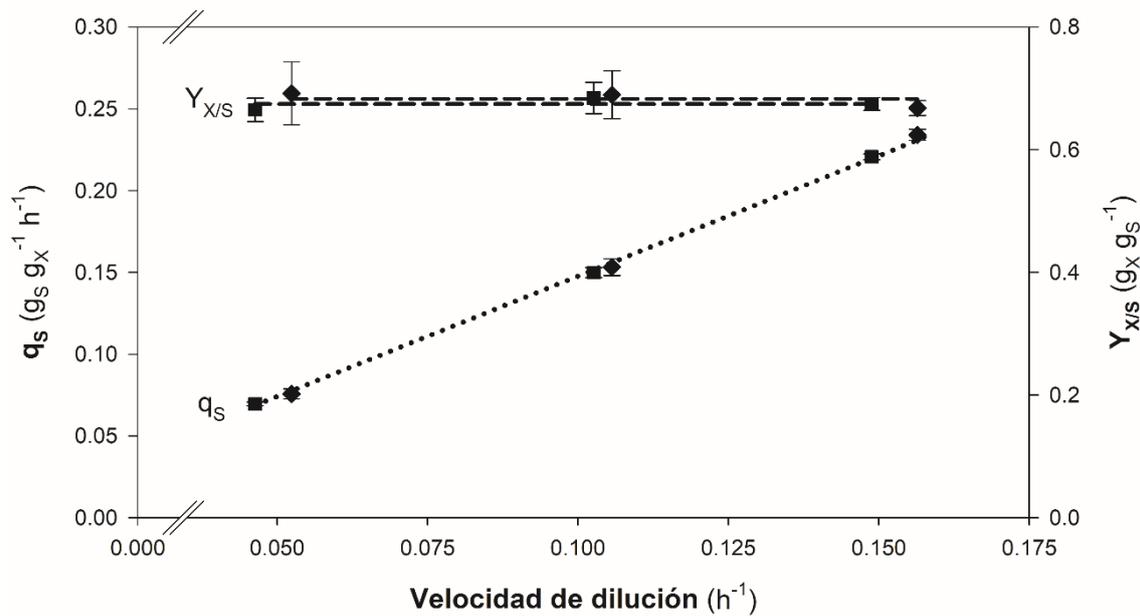


Fig. 7.3. Determinación de la velocidad específica de consumo de sustrato (glicerol) (q_s) y el rendimiento global de la biomasa respecto al sustrato ($Y_{X/S}$) para cultivos en continuo llevados a cabo con cepas productoras de CalB bajo la regulación de los promotores P_{GAP} (■) y P_{G2} (◆). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de los valores medios.

Concerniente a las cinéticas de producción obtenidas con cada uno de los promotores estudiados, éstas se hallan representadas en la Fig.7.4. En referencia al P_{GAP} , los valores de la velocidad específica de formación de producto (q_P) mostraron un patrón lineal a lo largo del plano de diluciones. Este comportamiento está en concordancia con el hecho que el P_{GAP} es un promotor que proviene del metabolismo central de carbono y está fuertemente influenciado por la velocidad específica de crecimiento (Çalik *et al.*, 2015; Garcia-Ortega *et al.*, 2016). Este hecho ha sido validado a lo largo de diversos estudios que muestran este mismo patrón en procesos de producción de diferentes proteínas recombinantes (Peebo and Neubauer, 2018). En contraste, el promotor P_{G2} además de presentar unos valores de q_P muy superiores del orden de un orden de magnitud hasta una velocidad de dilución de $0.1 h^{-1}$, disminuyendo a ~ 6 y 4 veces para una D de 0.10 y $0.15 h^{-1}$ respectivamente, comparado con el P_{GAP} . La cinética de producción presentó un patrón diferente, observándose un máximo no muy marcado a una velocidad de dilución de $\sim 0.10 h^{-1}$, dando lugar a una tendencia en forma de campana suave (*bell-shaped*), similar a lo observado por Prielhofer *et al.* (2018).

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

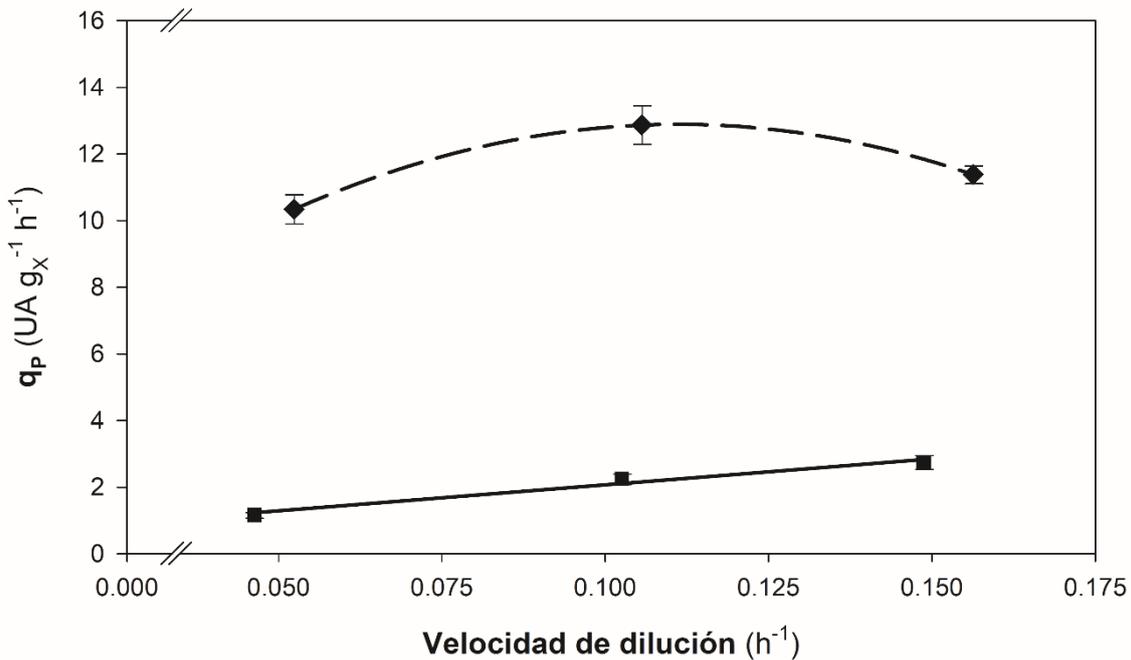


Fig. 7.4. Cinéticas de producción (*production kinetics*) obtenidas en cultivos en quimiostato a diferentes velocidades de dilución para los diferentes clones que expresan *CALB* bajo la regulación del P_{GAP} (■) y P_{G2} (◆). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de los valores medios.

Se conoce que el estado fisiológico celular puede afectar a procesos como la síntesis, plegamiento, glicosilación y secreción de proteínas, y por lo tanto influir en la producción de proteínas recombinantes y su cinética de producción. Estos procesos limitantes se denominan cuellos de botella (*bottlenecks*) y han sido ampliamente discutidos en *P. pastoris*, ya que involucran a otros procesos como la respuesta a proteínas mal plegadas (*unfolded protein response, UPR*), la degradación asociada al retículo endoplasmático (*ER-associated degradation, ERAD*) y el transporte ER-Golgi como parte de la ruta de secreción (*ER-Golgi trafficking*), dentro los más destacados (Puxbaum *et al.*, 2015).

Aunque el patrón observado en la q_P para el P_{G2} no se ajusta a una tendencia acoplada al crecimiento, no se puede descartar que este tipo de promotores sea de regulación constitutiva. Por lo tanto, para tener un mayor conocimiento del tipo de regulación del promotor *G2* es necesaria la realización de análisis complementarios que permitan conocer, por ejemplo, los niveles de transcripción de *CALB* y de genes relacionados con la actividad del promotor.

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

Por ejemplo, durante la caracterización del clon multicopia (*multi-copy clone*, MCC) de *P. pastoris* expresando el gen de la lipasa 1 de *Candida rugosa* (*CRL1*) bajo el P_{GAP} (capítulo 4), a pesar de no mostrar una tendencia lineal en la q_P , los niveles de transcripción de *CRL1* sí presentan una tendencia acoplada al crecimiento lo cual está de acuerdo con los niveles de transcripción observados en el gen nativo del promotor *GAP* (el gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, *TDH3*). Esto permitió comprender que, a pesar de mantener el tipo de regulación esperada para el P_{GAP} , ésta no se ve reflejada en la q_P al haber posibles limitaciones postranscripcionales.

Otra forma que permitiría conocer el tipo de regulación sería mediante la determinación de elementos reguladores *cis* (como los sitios de unión de los factores de transcripción, TFBS) y los *core promoter sequences* en la secuencia propia del promotor (Portela *et al.*, 2018). Sin embargo, este estudio requiere un profundo conocimiento de dichas regiones, lo cual se encuentra en fases iniciales de estudio. Por ejemplo, durante la ingenierización del P_{GAP} , Ata *et al.* (2017) recurrió al uso de secuencias putativas (*putative*) de *S. cerevisiae* al no encontrar información de estos elementos para *P. pastoris*.

En paralelo a la redacción de este capítulo se está llevando a cabo el análisis transcripcional de diversos genes diana en muestras obtenidas en los quimiostatos realizados para tener una mejor visión de los efectos intracelulares desencadenados por el uso de los promotores *GAP* y *G2* sobre la producción de CalB.

A pesar de no tener información concluyente respecto al tipo de regulación del P_{G2} , el conocimiento obtenido de las cinéticas de producción será determinante en el momento de establecer un rango de trabajo con relación a las velocidades específicas de crecimiento (μ). Éstas permitirán proponer estrategias de bioproceso que hagan posible la maximización de la eficiencia en el uso de estos nuevos promotores y aprovechar al máximo sus capacidades en términos de concentración de producto (*titer*), productividad (Q_P) o de rendimientos ($Y_{P/S}$), ya sea en cultivos en modo de operación continuo o *fed-batch*, siendo este último el más utilizado por parte de la industria biotecnológica (García-Ortega *et al.*, 2019). Para el caso del P_{GAP} , la optimización de actividad final y productividad volumétrica serán óptimos a μ cercanas a la μ máxima; mientras que para el caso del P_{G2} , dependiendo el parámetro a optimizar será preferible usar trayectorias de μ que estén sólo ligeramente por debajo del valor correspondiente a la q_P máxima (*titer*) o bien del orden o hasta incluso superiores a ésta (Q_P).

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

Por otro lado, el conocimiento de las cinéticas de producción permitiría tener un mayor control sobre la expresión de proteínas heterólogas, lo cual es de gran interés sobre todo para la producción de metabolitos donde intervienen diversas rutas metabólicas (Prielhofer *et al.*, 2017; Peña *et al.*, 2018).

7.3 Referencias

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., and Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 5301–5317.
- Ata, Ö., Prielhofer, R., Gasser, B., Mattanovich, D., and Çalık, P. (2017) Transcriptional engineering of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for improved heterologous protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* **114**: 2319–2327.
- Barrigón, J.M., Montesinos, J.L., and 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? *Biochem Eng J* **75**: 47–54.
- Baumann, K., Maurer, M., Dragosits, M., Cos, O., Ferrer, P., and Mattanovich, D. (2008) Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng* **100**: 177–183.
- Beiroti, A., Hosseini, S.N., Aghasadeghi, M.R., and Norouzian, D. (2019) Comparative study of μ -stat methanol feeding control in fed-batch fermentation of *Pichia pastoris* producing HBsAg: an open-loop control versus recurrent artificial neural network-based feedback control. *J Chem Technol Biotechnol* **94**: 3924–3931.
- Çalık, P., Ata, Ö., Güneş, H., Massahi, A., Boy, E., Keskin, A., *et al.* (2015) Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochem Eng J* **95**: 20–36.
- Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P., and Stillman, C.A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* **9**: 1316–1323.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S., and Raschke, W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol* **11**: 905–910.
- Fischer, J.E. and Glieder, A. (2019) Current advances in engineering tools for *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* **59**: 175–181.
- García-Ortega, X., Adelantado, N., Ferrer, P., Montesinos, J.L., and Valero, F. (2016) A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*: From specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. *Process Biochem* **51**: 681–691.
- García-Ortega, X., Cámara, E., Ferrer, P., Albiol, J., Montesinos-Seguí, J.L., and Valero, F. (2019) Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol free GAP promoter. Where do we stand? *N Biotechnol* **53**: 24–34.
- García-Ortega, X., Ferrer, P., Montesinos, J.L., and Valero, F. (2013) Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter. *Biochem Eng J* **79**: 172–181.

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

- Garrigós-Martínez, J., Nieto-Taype, M.A., Gasset-Franch, A., Montesinos-Seguí, J.L., García-Ortega, X., and Valero, F. (2019) Specific growth rate governs *AOX1* gene expression, affecting the production kinetics of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) P_{AOX1} -driven recombinant producer strains with different target gene dosage. *Microb Cell Fact* **18**: 187.
- Gasser, B. and Mattanovich, D. (2018) A yeast for all seasons – Is *Pichia pastoris* a suitable chassis organism for future bioproduction? *FEMS Microbiol Lett* **365**: 181.
- Gasser, B., Steiger, M.G., and Mattanovich, D. (2015) Methanol regulated yeast promoters: production vehicles and toolbox for synthetic biology. *Microb Cell Fact* **14**: 196.
- Hoskisson, P.A. and Hobbs, G. (2005) Continuous culture - Making a comeback? *Microbiology* **151**: 3153–3159.
- Huang, M., Bao, J., and Nielsen, J. (2014) Biopharmaceutical protein production by *Saccharomyces cerevisiae*: current state and future prospects. *Pharm Bioprocess* **2**: 167–182.
- Jungo, C., Marison, I., and von Stockar, U. (2007) Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut+ strain in transient continuous cultures. *J Biotechnol* **130**: 236–246.
- Lima, R.N., dos Anjos, C.S., Orozco, E.V.M., and Porto, A.L.M. (2019) Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. *Mol Catal* 75–105.
- Massahi, A. and Çalık, P. (2018) Naturally occurring novel promoters around pyruvate branch-point for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*): Pyruvate decarboxylase- and pyruvate kinase- promoters. *Biochem Eng J* **138**: 111–120.
- Moreira de Almeida, J.R., Pepe de Moraes, L.M., and Gonçalves Torres, F.A. (2005) Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*PGK1*) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast* **22**: 725–737.
- Müller, J.M., Bruhn, S., Flaschel, E., Friehs, K., and Risse, J.M. (2016) *GAP* promoter-based fed-batch production of highly bioactive core streptavidin by *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog* **32**: 855–864.
- Nieto-Taype, M.A., Garrigós-Martínez, J., Sánchez-Farrando, M., Valero, F., García-Ortega, X., and Montesinos-Seguí, J.L. (2020) Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Microb Biotechnol* **13**: 315–327.
- Peebo, K. and Neubauer, P. (2018) Application of continuous culture methods to recombinant protein production in microorganisms. *Microorganisms* **6**: 56.
- Peña, D.A., Gasser, B., Zanghellini, J., Steiger, M.G., and Mattanovich, D. (2018) Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metab Eng* **50**: 2–15.
- Ponte, X., Barrigón, J.M., Maurer, M., Mattanovich, D., Valero, F., and Montesinos-Seguí, J.L. (2018) Towards optimal substrate feeding for heterologous protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella* spp) fed-batch processes under P_{AOX1} control: a modeling aided approach. *J Chem Technol Biotechnol* **93**: 3208–3218.

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

- Ponte, X., Montesinos-Seguí, J.L., and Valero, F. (2016) Bioprocess efficiency in *Rhizopus oryzae* lipase production by *Pichia pastoris* under the control of P_{AOX1} is oxygen tension dependent. *Process Biochem* 1–10.
- Portela, R.M.C., Vogl, T., Ebner, K., Oliveira, R., and Glieder, A. (2018) *Pichia pastoris* alcohol oxidase 1 (AOX1) core promoter engineering by high resolution systematic mutagenesis. *Biotechnol J* **13**: 1700340.
- Portela, R.M.C., Vogl, T., Kniely, C., Fischer, J.E., Oliveira, R., and Glieder, A. (2017) Synthetic core promoters as universal parts for fine-tuning expression in different yeast species. *ACS Synth Biol* **6**: 471–484.
- Prielhofer, R., Barrero, J.J., Steuer, S., Gassler, T., Zahrl, R., Baumann, K., *et al.* (2017) GoldenPiCS: A Golden Gate-derived modular cloning system for applied synthetic biology in the yeast *Pichia pastoris*. *BMC Syst Biol* **11**: 123.
- Prielhofer, R., Maurer, M., Klein, J., Wenger, J., Kiziak, C., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2013) Induction without methanol: Novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **12**..
- Prielhofer, R., Reichinger, M., Wagner, N., Claes, K., Kiziak, C., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2018) Superior protein titers in half the fermentation time: Promoter and process engineering for the glucose-regulated *GTH1* promoter of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*.
- Puxbaum, V., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2015) Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 2925–2938.
- Robert, J.M., Lattari, F.S., Machado, A.C., de Castro, A.M., Almeida, R.V., Torres, F.A.G., *et al.* (2017) Production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia pastoris* under control of the promoter *PGK* using crude glycerol from biodiesel production as carbon source. *Biochem Eng J* **118**: 123–131.
- Schwarzahans, J.P., Luttermann, T., Geier, M., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2017) Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Adv* **35**: 681–710.
- Schwarzahans, J.P., Wibberg, D., Winkler, A., Luttermann, T., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2016a) Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microb Cell Fact* **15**: 84.
- Schwarzahans, J.P., Wibberg, D., Winkler, A., Luttermann, T., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2016b) Non-canonical integration events in *Pichia pastoris* encountered during standard transformation analysed with genome sequencing. *Sci Rep* **6**: 1–12.
- Tomàs-Gamisans, M., Ferrer, P., and Albiol, J. (2018) Fine-tuning the *P. pastoris* iMT1026 genome-scale metabolic model for improved prediction of growth on methanol or glycerol as sole carbon sources. *Microb Biotechnol* **11**: 224–237.
- Vogl, T., Gebbie, L., Palfreyman, R.W., and Speight, R. (2018) Effect of plasmid design and type of integration event on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol* **84**: 2712–2729.
- Vogl, T., Ruth, C., Pitzer, J., Kickenweiz, T., and Glieder, A. (2014) Synthetic core

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

promoters for *Pichia pastoris*. *ACS Synth Biol* **3**: 188–191.

Vogl, T., Sturmberger, L., Kickenweiz, T., Wasmayer, R., Schmid, C., Hatzl, A.M., *et al.* (2016) A toolbox of diverse promoters related to methanol utilization: Functionally verified parts for heterologous pathway expression in *Pichia pastoris*. *ACS Synth Biol* **5**: 172–186.

Yang, Z. and Zhang, Z. (2018) Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv* **36**: 182–195.

7. El uso de nuevos promotores como herramienta para una expresión eficiente de proteínas recombinantes en la factoría celular *Pichia pastoris*

8 Conclusions

The effect of different innovative operational strategies based on bioprocess and strain engineering in *P. pastoris* during the production of two lipases with industrial interest, *Candida rugosa* lipase 1 (Crl1) and *Candida antarctica* lipase B (CalB) was successfully evaluated. All the gathered results reinforce the establishment of *P. pastoris* as a robust cell factory, highly competitive, which can be employed efficiently for recombinant protein production (RPP) bioprocesses. Specific conclusions are detailed below:

- ❖ It was demonstrated the key role of production kinetics during the definition of optimal bioprocess strategies for RPP with *P. pastoris*. This relationship between specific production rate (q_P) and cell growth (μ) seems to be highly dependent on the intrinsic characteristics of the clone employed. It was supported through the characterization on chemostat cultures of two clones with contrasting performances on Crl1 production regulated under the constitutive *GAP* promoter (P_{GAP}). This difference was based on the different gene dosage of both clones (single-copy clone, SCC and multi-copy clone, MCC). The MCC displayed better results than SCC. Strikingly, also significant differences could be observed for the patterns of the production kinetics on each clone. Transcriptional analysis gave further information about the presence of potential post-transcriptional bottlenecks on MCC which could be responsible of the q_P saturation pattern observed at high dilution rates. Finally, fed-batch cultures performance supported the results obtained previously in chemostat cultures, which gives ground to tailor design the optimal fed-batch strategy according to the production kinetics towards the obtention of the maximal production efficiency.
- ❖ Carbon-starving has been established as a new interesting operational strategy for *P. pastoris* bioprocess optimization on fed-batch cultures. The characterization of this strategy in chemostat cultures carried out in the present work revealed an increase on production parameters for MCC, whereas no relevant effect was observed on SCC. Interestingly, an innovative transcriptomic analysis (RNAseq) was carried out with chemostat samples, pointing out the difference on the transcription of all the genes of the yeast. The implementation of this strategy on fed-batch had similar effects, with increments of more than 45 % on product yields with MCC. Therefore, the suitable use of this strategy will be specific for each

producer clone and should be tested on chemostat cultures before its implementation on fed-bath mode.

- ❖ The performance of classical promoters *GAP* (constitutive) and *AOXI* (methanol-inducible) were compared on chemostat cultures expressing Cr11 using SCC's and MCC's. Regarding to production performance, specifically q_P and yields, better results were obtained with P_{AOXI} in contrast with the respective homologous clone regulated under P_{GAP} . Although P_{GAP} showed lower values on key production parameters, economical evaluation should be necessary during the scale-up of the bioprocess, taking into account the drawbacks related to methanol utilization as substrate.

- ❖ Two methanol-free novel promoters, named P_{G1} and P_{G2} were characterized and compared with the constitutive P_{GAP} expressing *Candida antarctica* lipase B (CalB). Shake flask cultures gave a first assessment of the behaviour of these promoters under carbon limited conditions. Although both novel promoters showed better results in contrast to P_{GAP} , only P_{G2} was compared with P_{GAP} on chemostat cultures, because both present a similar regulation pattern, growth-coupled, and thus constitutive. Chemostat cultures revealed different pattern of production kinetics on each expression system, being linear for P_{GAP} clone and bell-shaped for P_{G2} . Therefore, with the aim of a rational design, the optimal bioprocess operating conditions must be different for each clone. Further transcriptional analyses are being performed, which will give complementary information in order to have a better understanding of the physiological effects derived from the use of P_{GAP} and P_{G2} on CalB production.

